

***Streptococcus pneumoniae* von Patienten mit hämolytisch-
urämischem Syndrom schädigen Endothelzellen durch aktiviertes
Plasmin und inhibieren das Komplementsystem.**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„*doctor rerum naturalium*“ (Dr. rer. nat.)



seit 1558

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Master of Science Christian Meinel
geboren am 15. Juni 1989 in Gera

Gutachter:

1. Prof. Dr. Peter F. Zipfel

Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. – Hans-Knöll-Institut (HKI)
Abteilung Infektionsbiologie
Beutenbergstraße 11a
07745 Jena

2. Prof. Dr. Hortense Slevogt

Zentrum für Innovationskompetenz (ZIK) Septomics
Arbeitsgruppe Host Septomics
Albert-Einstein-Strasse 10
07745 Jena

3. Prof. Dr. Petra Dersch

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH
Abteilung Molekulare Infektionsbiologie
Inhoffenstraße 7
38124 Braunschweig

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Zusammenfassung	X
Summary	XII
1 Einleitung	1
1.1 Das menschliche Immunsystem	1
1.1.1 Die angeborene Immunität	2
1.1.2 Die adaptive Immunität	3
1.2 Das Komplementsystem als zentraler Bestandteil der angeborenen Immunität	4
1.2.1 Initiation der Komplementkaskade	5
1.2.1.1 Der alternative Weg der Komplementaktivierung	5
1.2.1.2 Der klassische Weg der Komplementaktivierung	6
1.2.1.3 Der Lektin-Weg der Komplementaktivierung	6
1.2.2 C3-Konvertase und Amplifikation	7
1.2.3 C5-Konvertase und terminaler Weg	7
1.2.4 Regulation des Komplementsystems	9
1.2.4.1 Komplement Faktor H und Faktor H-Proteinfamilie	11
1.2.4.2 Plasminogen	13
1.3 Komplementevasion pathogener Mikroorganismen	14
1.3.1 Mikrobielle Komplementinhibitoren	14
1.3.2 Proteasen	15
1.3.3 Rekrutierung von humanen Komplementregulatoren	16
1.3.4 Zellwände und Polysaccharidkapseln	17
1.4 Gram-positive Bakterien	18
1.5 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	19
1.5.1 Virulenzfaktoren von <i>S. pneumoniae</i>	21
1.5.1.1 Translationselongationsfaktor Tu	24

1.5.1.2 Pneumokokkenoberflächenprotein C	25
1.6 Hämolytisch-urämisches Syndrom	27
1.6.1 Typisches HUS	28
1.6.2 Atypisches HUS	29
1.6.3 DEAP-HUS.....	30
1.6.4 Pneumokokken-assoziiertes HUS	31
1.7 Ziel des Promotionsprojektes	32
2 Material und Methoden	34
2.1 Material	34
2.1.1 Puffer	34
2.1.2 Proteine, Sera und Antikörper	38
2.1.3 Primer	39
2.1.4 Bakterienstämme	40
2.2 Methoden	40
2.2.1 Bakterienkultur	40
2.2.1.1 <i>S. pneumoniae</i> Kultur	40
2.2.1.2 <i>Escherichia coli</i> Kultur	40
2.2.2 Hitzeinaktivierung von normalem humanen Serum.....	41
2.2.3 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	41
2.2.3.1 Protein-ELISA.....	41
2.2.3.2 <i>Whole cell</i> -ELISA	42
2.2.4 Durchflusszytometrie.....	42
2.2.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.2.6 Silberfärbung.....	44
2.2.7 Western Blot.....	44
2.2.8 Aufreinigung der Membranproteinfraktion von <i>S. pneumoniae</i>	45
2.2.9 Isolation genomischer DNA von <i>S. pneumoniae</i>	45
2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion	46
2.2.11 Agarosegelelektrophorese.....	46
2.2.12 Sequenzierung und <i>sequence alignments</i>	47

2.2.13 Rekombinante Expression von PspC der klinischen Isolate	47
2.2.13.1 PspC-Expression.....	47
2.2.13.2 Aufreinigung des rekombinant-exprimierten PspC.....	48
2.2.13.3 Rückfaltung des rekombinant-exprimierten PspC	48
2.2.13.4 Bestimmung der PspC-Proteinkonzentration	49
2.2.14 <i>Bio-Layer</i> -Interferometrie.....	49
2.2.15 Bestimmung der Cofaktoraktivität von Faktor H.....	49
2.2.16 Opsonisierung von Pneumokokken	50
2.2.17 Phagozytose von Pneumokokken durch humane neutrophile Granulozyten.....	51
2.2.17.1 Isolation von humanen neutrophilen Granulozyten	51
2.2.17.2 Phagozytoseassay	51
2.2.18 Kultur von Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene.....	52
2.2.19 Adhäsion von Pneumokokken an HUVEC	52
2.2.20 Plasminogen-Aktivierungsassay.....	53
2.2.20.1 Plasmin-vermittelte Spaltung von S-2251	53
2.2.20.2 Plasmin-vermittelte Spaltung von Fibrinogen.....	54
2.2.20.3 Plasmin vermittelte Spaltung von C3b	55
2.2.21 Einfluss von Plasmin auf die Vitalität von HUVEC	55
2.2.22 Einfluss von Pneumokokken-gebundenem Plasmin auf die Vitalität von HUVEC	56
2.2.22.1 Zytotoxizitätsassay zum Einfluss von Pneumokokken-gebundenem Plasmin auf die Vitalität von HUVEC	56
2.2.22.2 Fluoreszenzmikroskopie zum Einfluss von Pneumokokken-gebundenem Plasmin auf die Vitalität von HUVEC	57
2.2.22.3 Quantifizierung der Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen zur Exposition subendothelialer Matrix	57
2.2.23 Statistische Analysen	58
3 Ergebnisse.....	59
3.1 Die klinischen <i>S. pneumoniae</i> -Isolate binden den humanen Komplementregulator Faktor H an ihre Oberfläche	59

3.2 Die klinischen Pneumokokkenstämme exprimieren den Virulenzfaktor Tuf auf ihrer Oberfläche	61
3.3 Sp _{HUS} A und Sp _{HUS} B exprimieren große Mengen PspC auf ihrer Oberfläche	63
3.3.1 Sp _{HUS} A und Sp _{HUS} B exprimieren PspC-Isotypen der Subgruppen PspC6 und PspC3	65
3.3.2 PspC der beiden klinischen Stämme wurde rekombinant exprimiert	67
3.4 PspC6 und PspC3 binden Faktor H und PspC-gebundenes Faktor H hat Cofaktoraktivität	67
3.5 Faktor H auf der Oberfläche von Sp _{HUS} A und Sp _{HUS} B hat Cofaktoraktivität und reduziert Opsonisierung sowie Phagozytose	70
3.6 Faktor H verstärkt die Adhäsion von Sp _{HUS} A und Sp _{HUS} B an humane Endothelzellen	72
3.7 Die klinischen <i>S. pneumoniae</i> -Isolate binden den humanen Komplementregulator Plasminogen an ihre Oberfläche	73
3.8 PspC6 und PspC3 binden Plasminogen	75
3.9 PspC-gebundenes und aktiviertes Plasmin spaltet S-2251 sowie natürliche Substrate	77
3.10 Pneumokokken-gebundenes und aktiviertes Plasmin spaltet S-2251 sowie natürliche Substrate	79
3.11 Aktiviertes Plasmin schädigt humane Endothelzellen	82
3.12 Aktiviertes Plasmin auf der Oberfläche Sp _{HUS} A und Sp _{HUS} B schädigt humane Endothelzellen und exponiert die subendotheliale Matrix	84
4 Diskussion	87
4.1 Die klinischen <i>S. pneumoniae</i> -Isolate entgehen den Attacken durch das humane Komplementsystem	87
4.2 Die klinischen <i>S. pneumoniae</i> -Isolate adhärieren effizient an humane Endothelzellen	92
4.3 Die klinischen <i>S. pneumoniae</i> -Isolate induzieren pHUS durch Plasmin-vermittelte Schädigung von humanen Endothelzellen	93
Literaturverzeichnis	98
Eigenständigkeitserklärung	i
Lebenslauf	ii
Vorträge, Poster, Auszeichnungen und Publikationen	iii
Danksagung	v

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
aHUS	atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom
AP	alternativer Weg der Komplementaktivierung
bzw.	beziehungsweise
C1INH	C1-Esterase-Inhibitor
C5L2	<i>C5a receptor-like 2</i>
ca.	circa
Cbp	<i>choline binding protein</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFHR1-5	<i>complement factor H-related proteins 1-5</i>
CP	klassischer Weg der Komplementaktivierung
CR1-4	<i>complement receptor 1-4</i>
CRlg	<i>complement receptor of the immunoglobulin superfamily</i>
DAF	<i>decay accelerating factor</i>
DAMPs	<i>damage associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEAP-HUS	<i>deficient for CFHR proteins and Factor H autoantibody positive hemolytic uremic syndrome</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
EF-Tu	Translationselongationsfaktor Tu
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FHL-1	<i>Factor H-like protein 1</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HDL	<i>high density lipoproteins</i>
HKI	Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e. V. Hans-Knöll-Institut
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
Hyl	Hyaluronat-Lyase
Ig	Immunglobulin

K1-5	Kringel-Domänen 1-5
kbp	Kilobasenpaar
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KP	kovalent gebundene Proteine
LP	Lektin-Weg der Komplementaktivierung
LytA	N-acetyl-muramoyl-L-Alanin-Amidase
LytB	β-N-Acetylglucosamidase
LytC	β-N-Acetylmuramidase
mAK	monoklonaler Antikörper
MAMPs	<i>microbe-associated molecular patterns</i>
MASP	MBL-assoziierte Serinproteasen
Max.	Maximum
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MCP	<i>membrane cofactor protein</i>
MFI	<i>median fluorescence intensity</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MP	Membranproteinfraktion
MW	Mittelwert
Nan	Neuraminidase
NKP	nicht-kovalent gebundene Proteine
ns	nicht signifikant
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
PaAP	alkalische Phosphatase von <i>P. aeruginosa</i>
PaE	Elastase von <i>P. aeruginosa</i>
pAK	polyklonaler Antikörper
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PavA	Pneumokokken-Adhärenz- und Virulenzfaktor A
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pHUS	<i>Streptococcus pneumoniae</i> -assoziiertes hämolytisch-urämisches Syndrom
Ply	Pneumolysin
Pra1	pH-reguliertes Antigen 1
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PsaA	<i>pneumococcal surface adhesin A</i>
PspA	<i>pneumococcal surface protein A</i>
PspC	<i>pneumococcal surface protein C</i>
px	Pixel

RCA	<i>regulator of complement activation gene cluster</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Svedberg
SC	<i>secretory component</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SCIN	<i>staphylococcal complement inhibitor</i>
slgA	sekretorisches Immunglobulin A
SIGNR1	<i>SIGN-related 1</i>
SLO	sekundär lymphatische Organe
STEC	Shiga-Toxin produzierende <i>E. coli</i>
Stx	Shiga-Toxin
TCC	<i>terminal complement complex</i>
TP	terminaler Weg der Komplementkaskade
tPA	gewebespezifischen Plasminogenaktivator
Tuf	Translationselongationsfaktor Tu
uPA	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das humane Komplementsystem.....	8
Abbildung 2: Faktor H und die Mitglieder der Faktor H-Proteinfamilie	12
Abbildung 3: Die Struktur des Komplementinhibitors Plasminogen	14
Abbildung 4: Der Zellwandaufbau Gram-positiver Bakterien	19
Abbildung 5: Überblick über die Virulenzfaktoren von <i>S. pneumoniae</i>	24
Abbildung 6: Die Struktur des polymorphen und multifunktionalen PspC	27
Abbildung 7: Die Pathogenese von HUS.....	28
Abbildung 8: Die <i>S. pneumoniae</i> -Isolate der HUS-Patienten binden Faktor H	60
Abbildung 9: Die klinischen <i>S. pneumoniae</i> -Isolate exprimieren Tuf auf ihrer Oberfläche	62
Abbildung 10: Die klinischen <i>S. pneumoniae</i> -Isolate exprimieren PspC auf ihrer Oberfläche	64
Abbildung 11: Die klinischen <i>S. pneumoniae</i> -Isolate exprimieren einen seltenen und einen unbekannten PspC-Isotypen	66
Abbildung 12: PspC von Sp _{HUS} A und Sp _{HUS} B wurde rekombinant in <i>E. coli</i> exprimiert	67
Abbildung 13: PspC der beiden klinischen Isolate bindet Faktor H und PspC-gebundener Faktor H hat Cofaktoraktivität.....	69
Abbildung 14: Faktor H auf der Oberfläche der klinischen Isolate hat Cofaktoraktivität und reduziert Opsonisierung sowie Phagozytose.....	71
Abbildung 15: Die klinischen <i>S. pneumoniae</i> -Isolate adhärieren in Präsenz von Faktor H effizienter an HUVEC	72
Abbildung 16: Die <i>S. pneumoniae</i> -Isolate der HUS-Patienten binden Plasminogen.....	74
Abbildung 17: PspC der beiden klinischen Isolate bindet Plasminogen.....	76
Abbildung 18: PspC-gebundenes Plasminogen wird zur Protease Plasmin aktiviert und spaltet das Chromogen S-2251 sowie natürliche Substrate	78
Abbildung 19: Plasminogen auf der Oberfläche der klinischen Isolate wird zur Protease Plasmin aktiviert und spaltet S-2251 sowie natürliche Substrate	81
Abbildung 20: Aktiviertes Plasmin schädigt HUVEC	83
Abbildung 21: Aktiviertes Plasmin auf der Oberfläche der klinischen <i>S. pneumoniae</i> -Isolate schädigt HUVEC	85
Abbildung 22: Aktiviertes Plasmin auf der Oberfläche der klinischen <i>S. pneumoniae</i> -Isolate exponiert die subendotheliale Matrix	86
Abbildung 23: Immunevasion der klinischen <i>S. pneumoniae</i> -Isolate und Plasmin-vermittelte Induktion von pHUS	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lösliche Komplementregulatoren	10
Tabelle 2: Oberflächengebundene Regulatoren und Komplementrezeptoren	11
Tabelle 3: Rekombinante Proteine	38
Tabelle 4: Antikörper und Antisera	39
Tabelle 5: Primer	39
Tabelle 6: Bakterienstämme	40
Tabelle 7: Bestandteile von zwei 10 %igen SDS-Gelen	43
Tabelle 8: Bestandteile des PCR-Mastermixes	46
Tabelle 9: PCR-Standardprogramm.....	46
Tabelle 10: Vergleich der Proteinsequenz von PspC6 und PspC3 mit PspC3.1 von D39.....	66

Zusammenfassung

Streptococcus pneumoniae-assoziiertes hämolytisch-urämisches Syndrom (pHUS) ist eine schwere Nierenerkrankung, die hauptsächlich Kleinkinder im Alter unter 2 Jahren betrifft. Sie ist durch hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und akute Nierenschädigung, in Präsenz einer Pneumokokkeninfektion, charakterisiert. Die exakte Pathogenese von pHUS ist umstritten. Um neue Therapieansätze zu entwickeln, muss es also zunächst das Ziel sein, die Entstehung der Krankheit im Detail nachvollziehen zu können.

Die Komplementkaskade als initiale Immunantwort stellt eine effektive Verteidigung gegen in den Wirtskörper eindringende Mikroorganismen dar. Pathogene Mikroorganismen haben im Laufe der Evolution verschiedenste Strategien entwickelt, um die Aktivierung der Komplementkaskade zu inhibieren und damit ihr Überleben im Wirt zu sichern. Die am weitesten verbreitetste Vorgehensweise ist dabei die Rekrutierung humaner Komplementregulatoren zur Störung der Komplementaktivierung und -effektorfunktionen.

In der vorliegenden Doktorarbeit werden zwei klinische *S. pneumoniae*-Stämme von pHUS-Patienten hinsichtlich ihrer Komplementevasion charakterisiert. Beide Pneumokokkenisolate (Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B) exprimieren die Faktor H-bindenden Virulenzfaktoren Tuf und PspC auf ihrer Oberfläche. Dabei ist vor allem die PspC-Expression der klinischen Isolate stark erhöht. Die Sequenzen der Tuf-Proteine der beiden klinischen Stämme sind hoch konserviert und identisch mit denen von Referenzstämmen. Die PspC-Moleküle der beiden klinischen Isolate haben dagegen deutliche Sequenzunterschiede. Sp_{HUS}A exprimiert einen seltenen PspC-Isotypen der Subgruppe PspC6, während Sp_{HUS}B eine bislang unbekannte Variante der Subgruppe PspC3 exprimiert. Rekombinant exprimierte PspC-Moleküle der beiden klinischen Isolate binden den humanen Komplementregulator Faktor H. Das PspC-gebundene Faktor H hat Cofaktoraktivität und unterstützt somit die Faktor I-vermittelte Inaktivierung des Opsonins C3b.

Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B rekrutieren große Mengen Faktor H an ihre Oberfläche und Pneumokokken-gebundenes Faktor H hat Cofaktoraktivität. Durch Ausnutzen der komplementregulatorischen Funktion von Faktor H wird die komplementvermittelte Opsonisierung sowie Phagozytose der klinischen Isolate durch neutrophile Granulozyten reduziert. Die effiziente Bindung von Faktor H ermöglicht den klinischen *S. pneumoniae*-Stämmen damit eine wirkungsvolle Komplementevasion.

Der an die Bakterienoberfläche gebundene Faktor H verstärkt zudem die Adhäsion von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B an humane, vaskuläre Endothelzellen und damit das Potenzial der klinischen Stämme Wirtszellen zu schädigen.

Die klinischen Stämme binden außerdem große Mengen des Komplementregulators Plasminogen an ihre Oberfläche. In der vorliegenden Doktorarbeit wird PspC erstmals als

Plasminogen-bindendes Protein von *S. pneumoniae* identifiziert. PspC- und Pneumokokken-gebundenes Plasminogen wird durch humane Plasminogenaktivatoren zur aktiven Protease Plasmin konvertiert und inaktiviert C3b. Folglich trägt die PspC-vermittelte Bindung von Plasminogen zur Komplementevasion der klinischen Isolate bei.

Plasmin auf der Oberfläche von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B schädigt außerdem humane, vaskuläre Endothelzellen, induziert die Exposition der subendothelialen Matrix und erzeugt dadurch ein prothrombotisches Milieu. Dies könnte zur Aktivierung von Thrombozyten, Bildung intraluminaler Thromben sowie luminaler Obstruktionen führen und folglich mechanische Hämolyse, Störungen der Nierenfunktion sowie die Ausprägung von pHUS induzieren. Damit wird in der vorliegenden Studie erstmals ein Zusammenhang aus Plasmin-vermittelter Schädigung humaner, vaskulärer Endothelzellen und der Pathogenese von pHUS dargestellt.

Summary

Streptococcus pneumoniae-associated hemolytic uremic syndrome (pHUS) is a severe kidney disease, which mainly affects children younger than 2 years. It is defined by the presence of hemolytic anemia, thrombocytopenia and acute kidney damage in a patient with a pneumococcal infection. The exact pathogenesis of pHUS is controversial. To develop new therapeutic strategies, the disease and its development has to be understood in detail first.

The complement cascade as initial immune response represents a potent defense against microorganisms invading the human host. Pathogenic microorganisms evolved numerous strategies to disturb complement activation and therefore increase their survivability in the human host. The most widespread virulence mechanism is to recruit human complement regulators to disturb the activation of the complement cascade and to protect themselves from complement attack.

In the present study the complement evasion of two clinical isolates of *S. pneumoniae* from pHUS-patients was characterized. Both clinical strains (Sp_{HUS}A and Sp_{HUS}B) express the two Factor H-binding virulence proteins, translation elongation factor Tu (Tuf) and pneumococcal surface protein C (PspC). Especially the PspC expression is increased on the surface of the two clinical isolates. The sequences of Tuf from the two strains are highly conserved and identical to reference strains. In contrast, the PspC molecules from the two clinical *S. pneumoniae* isolates have prominent sequence variations. Sp_{HUS}A expresses a rare isotype of subgroup PspC6. Sp_{HUS}B expresses a so far unknown variant of PspC3. Recombinant expressed PspC of the clinical strains binds the human complement regulator Factor H. PspC-bound Factor H has cofactor activity and supports the Factor I-mediated inactivation of the opsonin C3b.

Sp_{HUS}A and Sp_{HUS}B recruit high amounts of Factor H to their surface and pneumococci-bound Factor H retains cofactor activity. By exploiting the complement inhibitory function of Factor H, complement-mediated opsonization and phagocytosis of the clinical isolates by human neutrophils is reduced. Thus, efficient Factor H binding improves the complement evasion of the clinical *S. pneumoniae* strains.

Surface-bound Factor H also increases adhesion of Sp_{HUS}A and Sp_{HUS}B to human, vascular endothelial cells and consequently their potential to damage the host cells.

The clinical strains bind high amounts of the complement regulator plasminogen to their surface. In the present study PspC is identified as plasminogen-binding protein of *S. pneumoniae* for the first time. PspC- and pneumococci-bound plasminogen can be converted to the active protease plasmin by human plasminogen activators and inactivates C3b. Therefore, PspC-mediated Plasminogen binding contributes to complement evasion of the clinical isolates.

Furthermore, Plasmin on the surface of Sp_{HUS}A and Sp_{HUS}B damages human, vascular endothelial cells, induces the exposition of the subendothelial matrix and thereby causes a prothrombotic milieu. This may lead to the activation of thrombocytes, the formation of intraluminal thrombi and luminal obstructions inducing mechanical hemolysis, disturbance of the renal function and thus the phenotype of pHUS. By that, the present study describes a connection of Plasmin-mediated damage of human, vascular endothelial cells and the pathogenesis of pHUS for the first time.

1 Einleitung

1.1 Das menschliche Immunsystem

Unsere Umgebung beherbergt eine Vielzahl von potenziell infektiösen Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilze, Viren, Protozoen und Parasiten. Diese können gefährliche Krankheiten verursachen und sogar zum Tod des Wirtsorganismus führen. Dass die meisten Infektionen allerdings eher von kurzer Dauer sind und selten permanente Schäden verursachen, liegt in der effizienten Verteidigung des menschlichen Organismus durch das humane Immunsystem begründet. Dieses hat vier Hauptaufgaben zu erfüllen. (i) Das Immunsystem muss eindringende Mikroorganismen erkennen und (ii) dabei zwischen körpereigenen sowie körperfremd unterscheiden. Infektiöse Mikroben sollten in der Folge eingedämmt und eliminiert werden. (iii) Um mögliche Schäden körpereigener Strukturen durch überschießende Immunreaktionen zu verhindern, ist eine komplexe Regulation der Immunantwort essenziell. (iv) Außerdem ist es wichtig, den humanen Organismus gegen wiederkehrende Bedrohungen gleicher Mikroorganismen mittels eines immunologischen Gedächtnisses zu schützen. Das Immunsystem greift dabei auf verschiedene Funktionen zahlreicher Organe, Gewebe, Zelltypen sowie Effektorsubstanzen zurück. Neben der Verteidigung gegen eindringende Mikroorganismen spielt das menschliche Immunsystem ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Beseitigung entarteter, beschädigter und toter Wirtszellen sowie deren Abfallprodukte, aber auch von körperfremden Agenzien, wie beispielsweise Toxinen [1, 2].

Die humane Immunantwort lässt sich in zwei funktionelle Ebenen, das angeborene und das adaptive Immunsystem, differenzieren. Die angeborene Immunität ist das evolutionär ältere System. Tiere wie auch Pflanzen besitzen dieses Abwehrsystem gegen Infektionen, was die Bedeutsamkeit der angeborenen Immunität unterstreicht. Das adaptive oder erworbene Immunsystem dagegen ist evolutionär jünger, komplexer und nur unter Vertebraten zu finden. Die zwei Ebenen des menschlichen Immunsystems treten bei der Abwehr mikrobieller Erstinfektionen zeitlich versetzt in Aktion. Sollten Mikroben, wie Bakterien, die physischen Barrieren des Wirts überwinden und in den Organismus eindringen, reagiert die angeborene Immunität sofort und versucht die Ausbreitung der Infektion zu verhindern. Überwinden pathogene Mikroorganismen die angeborene Immunität, so greift die adaptive Immunität. Diese wird durch das angeborene Immunsystem aktiviert, agiert aber zeitlich verzögert, da eine Anpassung der Immunantwort stattfindet, um eine erhöhte Wirksamkeit gegen die Pathogene zu erzielen [1-5].

1.1.1 Die angeborene Immunität

Die evolutionär ältere angeborene Immunität hat zwei wesentliche Aufgaben. Sie fungiert einerseits als spontaner Abwehrmechanismus gegen eindringende Mikroorganismen und aktiviert sowie moduliert andererseits die zeitlich verzögerte adaptive Immunität. Zu den Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität gehören natürliche Barrieren, zelluläre Komponenten wie Phagozyten oder natürliche Killerzellen, und humorale Komponenten, welchen die komplexen Proteinkaskaden des Komplement-, des Koagulations- und des Kallikrein-Kinin-Systems angehören. Diese vielfältigen Komponenten sind Keimbahn-codiert und damit dem Organismus „angeboren“.

Die erste Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems sind natürliche Barrieren. Man unterscheidet physische Barrieren wie Haut oder Schleimhäute und chemische Barrieren. Physische Barrieren bestehen aus Epithelzellen und können, insofern sie intakt sind, nicht durch Mikroben passiert werden. Chemische Barrieren, wie sekretierte antimikrobielle Peptide und Enzyme (Defensine, Lysozym), niedrige pH-Werte (Magensäure) und Schleim inhibieren dagegen die Vermehrung potenziell pathogener Mikroorganismen. Auch kommensale Mikroorganismen, die beispielsweise den humanen Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt kolonisieren, hemmen die Invasion durch Pathogene [1-4].

Überwinden Pathogene die natürlichen Barrieren des menschlichen Körpers und dringen in das Wirtsgewebe oder den Blutkreislauf ein, wird innerhalb von Sekunden die zweite Verteidigungslinie der angeborenen Immunität in Form von Immunzellen und humoralen Komponenten aktiviert [1]. Dabei spielen Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) eine zentrale Rolle. Diese identifizieren einerseits Pathogen- oder Mikroben-assoziierte molekulare Muster (*pathogen- or microbe-associated molecular patterns*, PAMPs oder MAMPs), wie beispielsweise Lipopolysaccharide oder Teichonsäuren, welche nicht von körpereigenen Zellen exprimiert werden, dagegen aber für das Überleben bestimmter Mikroben essenziell sind. Andererseits detektieren PRRs Alarmine (*damage associated molecular patterns*, DAMPs) wie intrazelluläre Hitzeschockproteine nekrotischer Zellen, welche zwar körpereigene Strukturen sind, aber unter normalen Umständen nicht im extrazellulären Milieu vorliegen [6, 7]. PRRs werden auf der Oberfläche zahlreicher Immunzellen exprimiert und beinhalten verschiedene Rezeptortypen wie Toll-ähnliche-, *Scavenger*- oder C-Typ Lektin-Rezeptoren. Zudem sind auch intrazelluläre PRRs, wie *NOD-like*-Rezeptoren und lösliche PRRs wie Pentraxine, Fikoline und Kollektine, bekannt [1]. Zusammen genommen sind die PRRs in der Lage, mehr als 10^3 unterschiedliche molekulare Strukturen zu erkennen [3]. Werden invasive Mikroorganismen mittels PRRs durch neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen oder Makrophagen entdeckt, nehmen diese Zellen die Mikroben aktiv in ihren Zellkörper auf. Man spricht von Phagozytose. Im Zellinneren werden die Mikroorganismen dann in Phagolysosomen zerstört. Des Weiteren

können Phagozyten, aber auch andere Immunzellen der angeborenen Immunität wie natürliche Killerzellen und Mastzellen antimikrobielle Substanzen abgeben, um extrazelluläre Mikroben direkt zu schädigen. Sie können ebenfalls Zytokine sekretieren, welche zusätzliche Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems anlocken und so schließlich auch die adaptive Immunantwort modulieren [2, 4].

Neben der zellvermittelten Antwort auf invasive Mikroorganismen spielt auch die humorale Antwort der angeborenen Immunität eine wichtige Rolle. Hier ist vor allem das in Kapitel 1.2 im Detail beschriebene Komplementsystem zu nennen, welches die Opsonisierung eindringender Mikroben induziert, durch lytische Komplexe deren Zellmembran schädigt und proinflammatorische Zytokine sowie antimikrobielle Peptide produziert [8-10].

Das angeborene Immunsystem ist fähig, einen Großteil eindringender Mikroorganismen zu erkennen und entstehende Infektionen bereits früh zu eliminieren. Die Reaktionen der angeborenen Immunität führen allerdings nicht zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses [1].

1.1.2 Die adaptive Immunität

Reicht die angeborene Immunantwort nicht aus, um eine Infektion zu eliminieren, greift die bei Erstinfektionen zeitlich verzögerte adaptive Immunität. Dieses evolutionär jüngere System besteht aus einer zellulären Komponente, den B- und T-Lymphozyten, sowie einer humoralen Komponente, den antigenspezifischen Antikörpern, auch Immunglobuline (Ig) genannt. B-Lymphozyten reifen im Knochenmark, T-Lymphozyten im Thymus. Sie wandern anschließend als naive Zellen in die Peripherie, die Blutbahn, das Lymphsystem und die sekundären lymphatischen Organe (SLO). Jeder Lymphozyt exprimiert einen Zelltyp-spezifischen Rezeptor (B-Zell- oder T-Zell-Rezeptor), der während der Reifung durch DNA-Rekombination eine einzigartige Antigenspezifität entwickelt hat.

Im Laufe einer Infektion werden Mikroorganismen von so genannten „professionellen“ antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, Makrophagen oder B-Lymphozyten phagozytiert. Diese verdauen die Mikroben in Phagolysosomen und präsentieren im Anschluss deren Bestandteile als Antigene über einen Haupthistokompatibilitätskomplex I oder II auf ihrer Oberfläche. Zeitgleich exprimieren die antigenpräsentierenden Zellen costimulatorische Moleküle und bewegen sich in die SLO. Dort treffen sie auf naive Lymphozyten. Erkennen nun beispielsweise T-Lymphozyten über ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor das präsentierte Antigen und erfolgt zeitgleich eine Costimulation durch die antigenpräsentierende Zelle, differenzieren naive T-Lymphozyten in T-Effektorzellen. Dabei unterscheidet man drei wesentliche Typen: (i) die T-Helferzellen, welche B-

Zelldifferenzierung, Antikörperproduktion sowie Makrophagenaktivierung stimulieren, (ii) zytotoxische T-Zellen, welche Zytotoxine wie Perforin oder Granulysin sekretieren, um Pathogen-infizierte Wirtszellen zu zerstören, und (iii) regulatorische T-Zellen, welche die Reaktionen anderer Immunzellen durch die Sekretion inhibitorischer Moleküle mäßigen und so die Toleranz gegen Selbstantigene unterstützen [1, 2, 4, 11].

Naive B-Lymphozyten werden ebenfalls in den SLO aktiviert. Dazu sind die Erkennung eines präsentierten Antigens durch den spezifischen B-Zell-Rezeptor sowie eine simultane Stimulation durch eine aktivierte T-Helferzelle nötig. Auf die Aktivierung erfolgt die klonale Selektion und Proliferation der B-Lymphozyten. Außerdem differenzieren diese zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen. Plasmazellen sind die Ig-produzierenden Zellen des menschlichen Immunsystems. Antikörper besitzen eine große Diversität und hohe Antigen-Spezifität. Sie befinden sich membrangebunden auf B-Lymphozyten (B-Zell-Rezeptor) oder werden in die Zirkulation abgegeben. Man unterscheidet in Abhängigkeit der Struktur IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Antikörper bilden den humoralen Anteil der adaptiven Immunreaktion und haben diverse Funktionen. Sie opsonisieren und neutralisieren Antigene wie Mikroben oder Toxine, vermitteln Ig-abhängige Zytotoxizität und aktivieren die Komplementkaskade. Gedächtniszellen spielen eine Wichtige Rolle für das immunologische Gedächtnis. Sie persistieren im menschlichen Organismus, werden bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger rasch reaktiviert und ermöglichen damit einen lang anhaltenden immunologischen Schutz [5, 12].

Durch den Stimulations- und Differenzierungsprozess der Lymphozyten benötigt die adaptive Immunität eine längere Aktivierungszeit als die angeborene Immunantwort. Allerdings besitzt sie, durch die Rekombination der genetischen Information im Zuge der B- und T-Zellrezeptorreifung, eine enorme Vielfalt an Antigenspezifitäten und ermöglicht damit eine Adaption an infizierende Pathogene. Zudem besitzt das erworbene Immunsystem im Gegensatz zur angeborenen Immunität die Möglichkeit, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden und damit den menschlichen Organismus über längere Zeiträume zu schützen [1, 2].

1.2 Das Komplementsystem als zentraler Bestandteil der angeborenen Immunität

Das Komplementsystem stellt den zentralen Teil der angeborenen Immunität dar und wurde erstmals im späten 19. Jahrhundert von Paul Ehrlich und Jules Bordet als Bestandteil des Blutes beschrieben, welcher antikörperabhängige Effektorfunktionen unterstützt, Opsonophagozytose verstärkt und Zellen lysiert [8, 13]. Das Komplementsystem stellt damit eine effiziente Verteidigung gegen in den Wirtskörper eindringende Mikroorganismen dar. Heute ist allerdings erwiesen, dass das Komplementsystem weitere bedeutende

Effektorfunktionen besitzt. So spielt es eine wichtige Rolle für die zelluläre Integrität, die Gewebehomöostase, die Regulation neuronaler Entwicklungsprozesse sowie für die Modifizierung der adaptiven Immunreaktion und der Blutgerinnungskaskade [8, 14-17].

Das Komplementsystem ist eine multi-enzymatische Kaskade, bestehend aus mehr als 60 Proteinen und Aktivierungsfragmenten, welche vorwiegend in der Leber synthetisiert werden. Die Komplementproteine zirkulieren in Körperflüssigkeiten wie dem Blut und werden dort aktiviert [14]. Dringen körperfremde Mikroorganismen in den Wirtsorganismus ein, löst dies binnen weniger Sekunden eine Komplementreaktion aus. Dabei erfolgt die Aktivierung der Komplementkaskade sequenziell durch drei Komplementaktivierungswege und induziert eine streng regulierte, antimikrobielle Immunantwort [18].

Die Komplementkaskade wird in vier wesentliche Schritte untergliedert: (i) Initiation der Komplementaktivierung, (ii) Aktivierung und Amplifikation der C3-Konvertase, (iii) Aktivierung der C5-Konvertase und (iv) Zusammensetzung des terminalen Komplementkomplexes (Abbildung 1) [8].

1.2.1 Initiation der Komplementkaskade

Die Komplementkaskade kann durch drei verschiedene Wege aktiviert werden: den alternativen (*alternative pathway*, AP), den klassischen (*classical pathway*, CP) und den Lektin-Weg (*lectin pathway*, LP) der Komplementaktivierung. Alle drei Wege resultieren in der Bildung der C3-Konvertase, einem Enzymkomplex, welcher die zentrale Komplementkomponente C3 spaltet [19].

1.2.1.1 Der alternative Weg der Komplementaktivierung

Der AP wird durch die spontane Hydrolyse der Thioesterbindung von C3 (185 kDa) aktiviert. Durch die damit einhergehende Konformationsänderung entsteht metastabiles C3(H₂O). Dieser als „*tick over*“ bekannte Prozess findet in Körperflüssigkeiten ständig mit einer Rate von ca. 0,005 % pro Stunde (bei 37°C *in vitro*) statt [20]. C3(H₂O) bindet den in der Flüssigphase befindlichen Faktor B (93 kDa), welcher dann durch die Serumprotease Faktor D (24 kDa) in die Fragmente Ba und Bb gespalten wird [21]. Dadurch entsteht die in der Flüssigphase vorliegende, initiale C3-Konvertase des AP C3(H₂O)Bb, welche C3 in C3a (9 kDa) und C3b (175 kDa) spaltet [22]. C3a hat antimikrobielle Aktivität und fungiert als Anaphylatoxin, indem es C3a-Rezeptor-exprimierende Immunzellen zu dem Ort der Komplementaktivierung lockt [8, 10]. C3b hingegen exponiert eine hochreaktive Thioestergruppe und bindet damit kovalent an umliegende Zelloberflächen. Folglich dient C3b als Opsonin der Komplementkaskade. Die neu gebildeten, oberflächenlokalisierten C3b-

Moleküle rekrutieren Faktor B, welcher durch Faktor D gespalten wird. Es entsteht C3bBb, die C3 Konvertase des AP, die durch Properdin stabilisiert wird [8, 23, 24].

1.2.1.2 Der klassische Weg der Komplementaktivierung

Der CP wurde als erster der drei Aktivierungswege entdeckt und deshalb als „klassisch“ determiniert [25]. Er wird auch als antikörperabhängiger Weg bezeichnet, da er durch Immunkomplexe der Immunglobuline M (IgM) und G (IgG) initiiert werden kann. Eine zentrale Rolle spielt dabei das Mustererkennungsmolekül C1q, welches die Fc-Regionen der antigenassoziierten Antikörper bindet. Zudem erkennt C1q auch Strukturen auf mikrobiellen Oberflächen oder apoptotischen Zellen sowie Pentraxine (wie z. B. C-reaktives Protein) und aktiviert nachfolgend den klassischen Weg des Komplementsystems. C1q ist Teil des C1-Komplexes (790 kDa), bestehend aus C1q und je zwei Molekülen C1r und C1s (C1qC1r₂C1s₂). Die Bindung von C1q an Liganden wie Immunkomplexe leitet eine Konformationsänderung im C1-Komplex ein, wodurch die Selbstaktivierung von C1r induziert wird. C1r wiederum konvertiert das Proenzym C1s zu einer aktiven Protease, welche dann C4 (200 kDa) in das Anaphylatoxin C4a (10 kDa) und das Opsonin C4b (190 kDa) spaltet. C4b exponiert ähnlich wie C3b eine reaktive Thioestergruppe und bindet damit an Oberflächen in unmittelbarer Nähe der Aktivierungsstelle. Außerdem fungiert C4b als Rezeptor für C2 (102 kDa). C4b-gebundenes C2 wird von C1s in C2a (32 kDa) und C2b (70 kDa) gespalten. Das größere Fragment C2b verbleibt gebunden an C4b, wodurch C4bC2b, die aktive C3-Konvertase des CP, entsteht [26-29].

1.2.1.3 Der Lektin-Weg der Komplementaktivierung

Der LP ähnelt funktionell dem CP und wird durch Bindung der Mustererkennungsmoleküle Mannose-bindendes Lektin (MBL) und Ficolin (L-, M- und H-Ficolin) an Kohlenhydratmuster wie Mannose oder N-Acetylglucosamin auf mikrobiellen Oberflächen initiiert [30, 31]. MBL und Ficolin entsprechen strukturell C1q des CP und assemblieren mit MBL-assoziierten Serinproteasen (MASP-1 und MASP-2), welche wiederum strukturelle Ähnlichkeiten zu C1r und C1s aufweisen. MASP-2 schneidet C4 und C2 und generiert damit die C3-Konvertase C4bC2b, vergleichbar der des CP. MASP-1 spaltet ausschließlich C2 und supplementiert damit den aktivierten LP durch Erhöhung der Effizienz des Konvertaseaufbaus [26, 31, 32].

1.2.2 C3-Konvertase und Amplifikation

Die C3-Konvertasen des AP (C3bBb) sowie des CP und des LP (C4b2b) stellen die Schlüsselenzyme der Komplementkaskade dar und initiieren wichtige Effektorfunktionen des Komplementsystems. Sie spalten C3 in C3a und C3b. Freigesetztes C3a hat antimikrobielle Aktivität und fungiert außerdem als Anaphylatoxin zur Rekrutierung von Immunzellen [10]. C3b bindet über eine exponierte, hochreaktive Thioestergruppe kovalent an umliegende Zelloberflächen von geschädigten, körpereigenen Zellen sowie an körperfremde Partikel. Dieser als Opsonisierung bekannte Prozess sorgt für eine verbesserte Erkennung und Phagozytose der markierten Partikel und Zellen durch Komplementrezeptor 1 (CR1)-exprimierende Phagozyten wie neutrophile Granulozyten [8]. Dabei findet zudem eine Amplifikationsschleife statt, da an abgelagerten C3b-Molekülen erneut C3-Konvertasen entstehen, welche den Prozess der Komplementaktivierung und Opsonisierung exponentiell beschleunigen. Theoretisch können dadurch in einer Minute ca. 10^{15} C3b-Moleküle entstehen [23]. Aufgrund dieses positiven Feedback-Mechanismus bedingen die durch die Amplifikationsschleife entstehenden C3-Konvertasen 80-90 % der totalen Komplementaktivierung [33].

1.2.3 C5-Konvertase und terminaler Weg

Neben seiner Funktion als Opsonin des Komplementsystems dient C3b auch der Bildung der C5-Konvertase. Dabei lagert sich ein zusätzliches C3b-Molekül an eine bereits bestehende C3-Konvertase an und bildet so die C5-Konvertasekomplexe C3bBbC3b und C4bC2bC3b. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung der Substratspezifität des Enzyms von C3 zu C5 (190 kDa). Die C5-Konvertase spaltet C5 in C5a (8 kDa) und C5b (182 kDa) [26]. C5a agiert ebenso wie C3a als Anaphylatoxin und lockt C5a-Rezeptor-exprimierende Immunzellen an den Ort der Komplementaktivierung. Allerdings hat C5a keine antimikrobielle Aktivität [8]. C5b dagegen initiiert den terminalen Weg der Komplementkaskade (TP) und bindet C6. Daraus resultierend entsteht der C5bC6-Komplex, welcher in der Folge C7 bindet. Der C5bC6C7-Komplex adhäriert an Zellmembranen. Durch Bindung von C8 kommt es zum Eindringen des C5bC6C7C8-Komplexes in die Zelloberfläche. Zudem werden bis zu 16 C9 Moleküle an den Komplex akquiriert. Dadurch bildet sich eine Pore, welche die Zielmembran durchdringt. Dieser nicht enzymatisch entstandene Komplex C5b-9_n wird als Membranangriffskomplex (*terminal complement complex*, TCC) bezeichnet und induziert Schäden an Zielzellmembranen sowie Zelllyse [9, 14, 19, 26]. Des Weiteren ist löslicher TCC (sC5b-9_n) im Plasma nachweisbar. Dieser hat keine lytische Funktion, soll aber zytokinähnlich wirken, die zelluläre Signaltransduktion beeinflussen und proinflammatorische Effekte haben [34, 35].

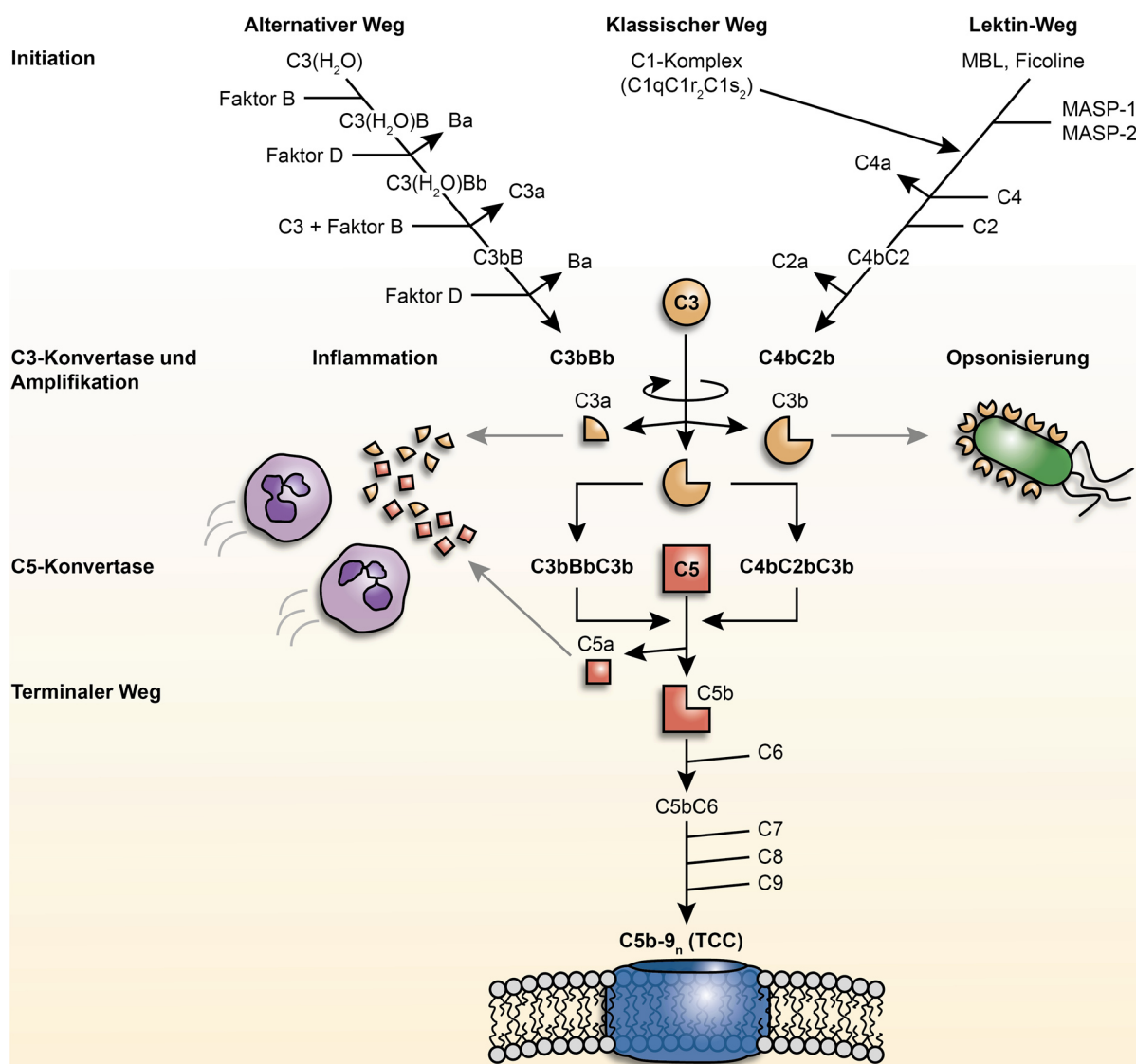


Abbildung 1: Das humane Komplementsystem

Das Komplementsystem wird in vier funktionelle Ebenen, die Initiation der Komplementkaskade, die Aktivierung und Amplifikation der C3-Konvertase, die Aktivierung der C5-Konvertase und den terminalen Weg, unterteilt. Die Komplementkaskade kann durch drei verschiedene Wege aktiviert werden: den alternativen (AP), den klassischen (CP) und den Lektin-Weg (LP). Der AP wird durch die spontane Hydrolyse von C3 zu C3(H₂O) initiiert („tick over“), während der CP durch Bindung des C1-Komplexes an IgM, IgG oder Pentraxine aktiviert wird. Der dem CP funktionell ähnelnde LP wird durch Bindung von MBL oder Ficolinen an Kohlenhydratmuster wie Mannose oder N-Acetylglucosamin auf mikrobiellen Oberflächen ausgelöst. Alle drei Wege resultieren in der Bildung der C3-Konvertase, einem Enzymkomplex, welcher C3 in das antimikrobielle Peptid und Anaphylatoxin C3a sowie in das Opsonin C3b spaltet. An oberflächengebundenen C3b-Molekülen entstehen erneut C3-Konvertasen, welche den Prozess der Komplementaktivierung und Opsonisierung exponentiell beschleunigen (Amplifikationsschleife). Bestehende C3-Konvertasen werden durch Anlagerung von C3b zu C5-Konvertasen moduliert. Diese spalten C5 in das Anaphylatoxin C5a sowie C5b. C5b bindet C6, wodurch der C5bC6-Komplex entsteht. Dieser bindet sequenziell C7, C8 sowie bis zu 16 C9 Moleküle und bildet dadurch eine lytische Pore in der Zielmembran, den Membranangriffskomplex (TCC).

1.2.4 Regulation des Komplementsystems

Die Aktivierung der Komplementkaskade unterscheidet nicht zwischen körpereigenen oder körperfremden Strukturen. Um die Gefahr durch Effektorfunktionen des Komplementsystems gegen gesunde, körpereigene Zelloberflächen und Gewebe zu minimieren, ist es daher zwingend notwendig, die Komplementaktivierung auf körpereigenen Strukturen effektiv zu inhibieren [23]. Dies wird durch lösliche, membrangebundene und membranintegrierte Komplementregulatoren gewährleistet, welche auf unterschiedlichen Ebenen der Komplementkaskade agieren, mitunter auf bestimmte Komplementaktivierungswege spezialisiert sind und verschiedene Effektorfunktionen des Komplementsystems modulieren (Tabellen 1 und 2) [8]. Die komplexe Interaktion von Flüssigphase-, membranassoziierten- und membranverankerten Regulatoren sichert die zelluläre Integrität. Eine beispielsweise durch Mutationen von Komplementregulatorgenen induzierte Dysregulation dieses sensiblen Systems resultiert in komplementvermitteltem Schaden an körpereigenen, gesunden Zellen und daraus folgend in Immunpathologie und Autoimmunerkrankungen [36].

Tabelle 1: Lösliche Komplementregulatoren [8, 37-44]

Regulator	Ligand/Aktivierungsweg	Funktion
Faktor H	C3-Konvertase, C3b, C3d (AP)	Cofaktor für Faktor I, Abbau der AP-C3-Konvertase
FHL-1	C3-Konvertase, C3b (AP)	Cofaktor für Faktor I, Abbau der AP-C3-Konvertase
Properdin	C3b (AP)	Stabilisierung der AP-C3-Konvertase
Carboxypeptidase N	C3a, C4a, C5a (AP, CP, LP, TP)	Inaktivierung von C3a und C5a
C4BP	C4 (CP, LP)	Cofaktor für Faktor I, Abbau der CP/LP-C3-Konvertase
C1q	IgG-, IgM-Immunkomplexe (CP)	Aktivierung des CP
C1INH	C1r, C1s, MASP2 (CP, LP)	Serinproteaseinhibitor
CFHR1	C5-Konvertase, TCC (TP)	C5-Konvertaseinhibitor, Inhibitor der TCC-Bildung
CFHR2	C3-Konvertase (AP), TCC (TP).	C3-Konvertaseinhibitor, Inhibitor der TCC-Bildung
CFHR3	C3b (AP)	Cofaktor für Faktor I
CFHR4	C3-Konvertase (AP, CP), C3b (AP)	Plattform für AP-C3-Konvertase, Rekrutierung von CRP, Verstärkung der Faktor H Cofaktoraktivität
CFHR5	C3-Konvertase, C3b (AP)	Cofaktoraktivität für Faktor I, Abbau der AP-C3-Konvertase, Rekrutierung von Properdin, Plattform für AP-C3-Konvertase
Clusterin	C7, C8 β , C9, TCC (TP)	Inhibitor der TCC-Bildung
Plasmin	C3-Konvertase C3b, C5 (AP, TP)	Spaltung von C3b und C5, Verstärkung der Faktor H Cofaktoraktivität
Vitronektin	C5b-7, TCC (TP)	Inhibitor der TCC-Bildung

Tabelle 2: Oberflächengebundene Regulatoren und Komplementrezeptoren [8, 40]

Regulator	Ligand/Aktivierungsweg	Funktion
C1qR	C1q (CP)	Unterstützung von Phagozytose und Zelladhäsion (Monozyten, B-Zellen)
C3aR	C3a (AP, CP, LP)	Rekrutierung von Immunzellen, Inflammationsmediation (verschiedene Leukozyten, Astrozyten, Neurone)
C5aR	C5a (TP)	Rekrutierung von Immunzellen, Inflammationsmediation (viele Leukozyten, Endothelzellen, renale Tubuluszellen)
C5L2	C5a (TP)	Rekrutierung von Immunzellen, Inflammationsmediation (Makrophagen, Neutrophile Granulozyten)
CR1	C3b, iC3b, C4b, C1q (AP, CP, LP)	Beseitigung von Immunkomplexen, Induktion der Phagozytose, Cofaktor für Faktor I, Regulation der C3-Degradierung (viele nukleäre Zellen, Erythrozyten)
CR2	C3dg, C3d und iC3b (AP, CP, LP)	Regulation der B-Zellfunktion, B-Zell-Corezeptor (B-, T- und dendritische Zellen)
CR3	iC3b, Faktor H (AP, CP, LP)	iC3b-abhängige Adhäsion und Phagozytose (verschiedene Leukozyten)
CR4	iC3b (AP, CP, LP)	iC3b-abhängige Phagozytose (Monozyten, Makrophagen)
CRlg	C3b, iC3b, C3c (AP, CP, LP)	iC3b-abhängige Phagozytose, Inhibierung des AP
MCP (CD46)	C3b, C4b (AP, CP, LP)	Cofaktor für Faktor I, C3b-, C4b-Degradation, Effektor für T-Zell-Reifung
DAF (CD55)	C4b2b, C3bBb (AP, CP, LP)	Abbau der C3-Konvertase
Protektin (CD59)	C8, TCC (TP)	Inhibitor der TCC-Bildung
SIGNR1	C1q (CP, LP)	Inflammationsmediation, Phagozytose

1.2.4.1 Komplement Faktor H und Faktor H-Proteinfamilie

Die Faktor H-Proteinfamilie besteht aus Faktor H, seiner verkürzten, alternativen Spleißvariante „*Factor H like protein 1*“ (FHL-1), sowie den „*Factor H related proteins 1-5*“ (CFHR1-CFHR5) (Abb. 2) [45]. Die verschiedenen Proteine der Faktor H Familie haben ähnliche Eigenschaften. Sie werden hauptsächlich in der Leber produziert und bestehen aus individuellen, ca. 60 Aminosäuren (aa) langen Domänen, den sogenannten *short consensus repeats* (SCR). Alle Mitglieder der Faktor H Proteinfamilie sind in dem *regulator of complement activation gene cluster* (RCA) auf Chromosom 1q32 kodiert [40].

Faktor H ist das derzeit am besten charakterisierte Mitglied der Faktor H Proteinfamilie und wurde initial als β 1H-Globulin identifiziert [8, 46]. Das Glykoprotein liegt im humanen Plasma mit einer Konzentration von 400-500 mg/l vor [47]. Faktor H hat eine

Größe von 150 kDa und besteht aus 20 SCR-Domänen. Die C-terminalen SCRs 18-20 sowie die SCRs 6-8 repräsentieren dabei die Oberflächenerkennungsregion von Faktor H [48-50]. Die N-terminalen SCRs 1-4 dagegen sind essenziell für die komplementregulatorische Aktivität von Faktor H als zentraler Inhibitor des AP. Faktor H schützt Wirtszellen durch die rasche Inaktivierung der alternativen C3-Konvertase auf Zelloberflächen. Einerseits konkurriert Faktor H mit Faktor B um die Bindung von C3b und beschleunigt damit den Zerfall des C3bBb-Komplexes (Zerfallsbeschleunigungsaktivität). Andererseits agiert Faktor H als Cofaktor für die Serumprotease Faktor I, welche C3b spaltet und inaktiviert (Cofaktoraktivität) [51-54]. Aufgrund seiner Zerfallsbeschleunigungs- und Cofaktoraktivität ist Faktor H von zentraler Bedeutung, um die Komplementaktivierung räumlich sowie zeitlich zu limitieren und damit humane Wirtszellen vor überschüssiger Komplementaktivität zu schützen [14]. Neben den SCRs 1-4 besitzt Faktor H noch zwei weitere Bindestellen für C3b (SCRs 12-14 und SCRs 19-20). Diese sind allerdings nicht essenziell für dessen Cofaktoraktivität [55-59]. Faktor H hat außerdem drei separate Bindungsdomänen für Heparin (SCR 7, SCR 13 und SCRs 19-20) sowie eine Bindestelle für Sialinsäuren (SCR 19-20) [60-63]. Neben seiner Funktion als Komplementinhibitor fungiert Faktor H außerdem als Adhäsionsligand für neutrophile Granulozyten sowie Blutplättchen [64, 65].

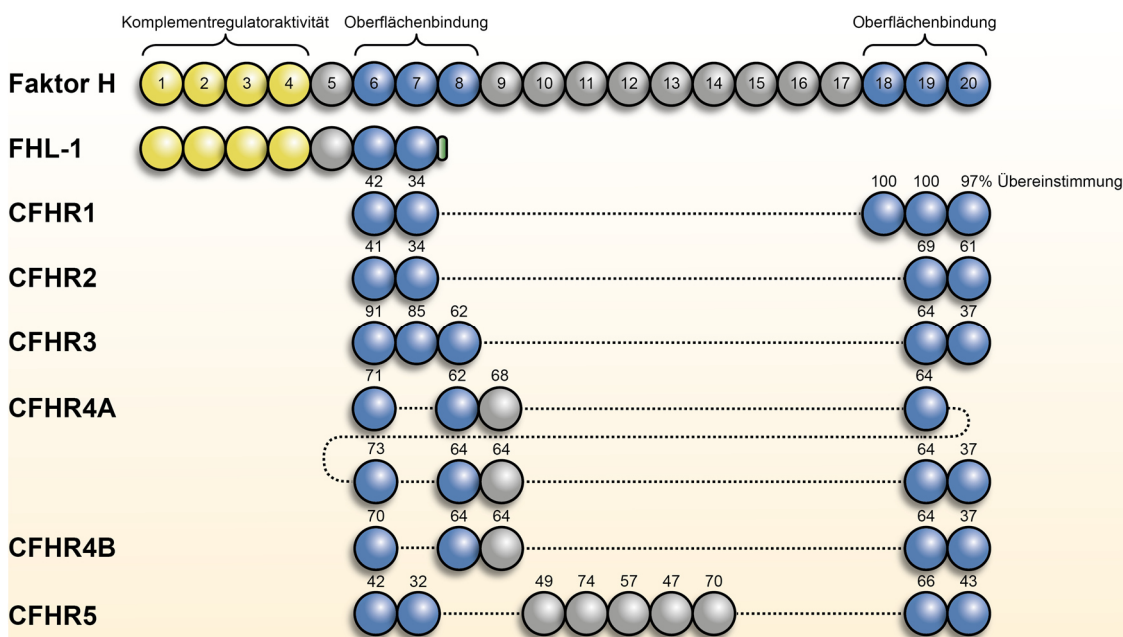


Abbildung 2: Faktor H und die Mitglieder der Faktor H-Proteinfamilie

Das humane Faktor H-Gencluster ist auf Chromosom 1q32 lokalisiert und besteht aus sechs verschiedenen Genen. FHL-1 ist ein alternatives Spleißprodukt von Faktor H, während CFHR4A und CFHR4B die beiden Spleißvarianten von CFHR4 darstellen. Alle Proteine der Faktor H-Familie sind Plasma-Glycoproteine, welche aus SCR-Domänen bestehen. Die Anzahl der SCRs variiert. Einzelne SCR-Domänen verschiedener CFHR-Proteine weisen hohe Sequenzhomologien untereinander und zu den SCRs von Faktor H auf. Entsprechend der Sequenzübereinstimmung sind homologe Domänen vertikal angeordnet. Die Zahlen über den SCR-Domänen entsprechen der prozentualen Proteinsequenzübereinstimmung zur korrespondierenden Domäne von Faktor H. Oberflächenerkennungsregionen (Faktor H SCRs 6-8 und 18-20) der Proteine sind blau dargestellt.

Domänen mit komplementregulatorischer Aktivität (Faktor H SCRs 1-4) sind gelb eingefärbt. Während C- und N-Termini der CFHR-Proteine konserviert sind und Oberflächenerkennungsregionen von Faktor H entsprechen, fehlen den CFHRs die SCRs mit komplementregulatorischer Aktivität. Die Abbildung wurde nach [40] adaptiert.

1.2.4.2 Plasminogen

Plasminogen (92 kDa) ist ein Einzelketten-Glykoprotein, das im humanen Plasma als inaktives Proenzym mit einer Konzentration von ca. 184 mg/l zirkuliert. Plasminogen wird hauptsächlich von Leberzellen gebildet und sekretiert [66]. Es besteht aus fünf homologen Kringel-Domänen und einer Serinproteasedomäne (Abb. 3) [66]. Das Plasminogen-Plasmin-System ist sensibel und wird streng reguliert. Durch Spalten einer Peptidbindung wird das Zymogen Plasminogen in die aktive Protease Plasmin umgewandelt. Verschiedene humane Aktivatoren wie der Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) und der gewebespezifische Plasminogenaktivator (tPA) oder bakterielle Aktivatoren wie Streptokinase und Staphylokinase, aber auch autokatalytisch wirkendes Plasmin können diese Funktion übernehmen. Um die Plasminaktivität dagegen zu limitieren, wird einerseits die uPA- und tPA-vermittelte Aktivierung von Plasmin durch die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren 1 und 2 blockiert. Andererseits wird die Plasminproteaseaktivität durch α -2-Antiplasmin und α -2-Makroglobulin direkt inhibiert. Aktiviertes Plasmin ist eine Serinprotease mit breiter Substratspezifität und fungiert als Schlüsselenzym des Koagulationssystems [43, 67, 68]. Durch die Degradation von polymerisiertem Fibrin in lösliche Fibrinolyseprodukte inhibiert Plasmin die Blutgerinnung und induziert die Fibrinolyse [69]. Außerdem spaltet Plasmin Komponenten der extrazellulären Matrix und der Basalmembran wie Laminin, Fibrin oder Fibrinogen und ist damit in die Migration eukaryotischer Zellen involviert [70, 71]. Durch Aktivierung von Metalloproteasen und Elastase reguliert Plasmin die Wundheilung, Geweberemodellierung, Angiogenese und Tumormetastasierung [72].

Neben seinen Funktionen als Modulator der Koagulationskaskade und Fibrinolyse fungiert Plasmin auch als Regulator des Komplementsystems, indem es die zentralen Komplementproteine C3b und C5 spaltet. Außerdem verstärkt Plasmin die Cofaktoraktivität von Faktor H für Faktor I. Plasmin blockiert damit die Progression der Komplementkaskade auf Ebene der C3- und C5-Konvertasen in der Flüssigphase sowie auf Zelloberflächen. Dadurch fungiert Plasmin als Komplementinhibitor und verknüpft außerdem die beiden wichtigen humanen Effektor-kaskaden, Komplement- und Koagulationssystem [43, 44, 73, 74].

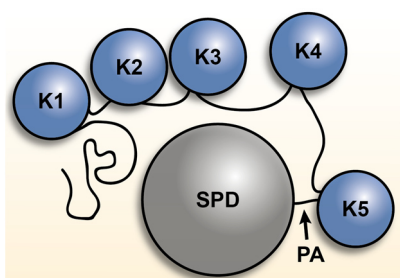


Abbildung 3: Die Struktur des Komplementinhibitors Plasminogen

Das Einzelketten-Glykoprotein Plasminogen zirkuliert im humanen Plasma als inaktives Proenzym der aktiven Protease Plasmin. Es besteht aus fünf homologen Kringel-Domänen (K1-K5) und einer Serinproteasedomäne (SPD), welche die katalytische Triade beinhaltet. Plasminogenaktivatoren (PA) spalten Plasminogen in eine schwere Kette, welche die 5 Kringeldomänen enthält, sowie eine leichte Kette, welche aus der SPD besteht. Die beiden Ketten bleiben durch Disulfidbrücken (nicht dargestellt) miteinander verbunden. Die Stelle der PA-vermittelten Spaltung ist mit einem Pfeil markiert. Die Abbildung wurde nach [43, 67] adaptiert.

1.3 Komplementevasion pathogener Mikroorganismen

Das menschliche Immunsystem, insbesondere die Komplementkaskade als schnell agierende, initiale Immunantwort, stellt einen effektiven Abwehrmechanismus dar, um das Eindringen von Mikroorganismen in den menschlichen Körper sowie deren Vermehrung und Verbreitung zu verhindern. Dennoch gibt es Pathogene, die in der Lage sind, Angriffen durch das Komplementsystem zu entgehen, so deren Überleben zu sichern, ihrerseits Wirtsgewebe zu schädigen und Krankheiten zu induzieren. Im Laufe der Evolution haben Pathogene verschiedenste Strategien entwickelt, um die Aktivierung der Komplementkaskade zu stören. Viele dieser Strategien haben gemeinsame Elemente und werden von verschiedensten Mikroorganismen, wie Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, Pilzen, Viren, Protozoen sowie Parasiten eingesetzt [18, 19, 75, 76].

1.3.1 Mikrobielle Komplementinhibitoren

Das humane Komplementsystem beruht auf hoch spezifischen Protein-Protein-Interaktionen. Durch Unterbrechungen einzelner Bindungsereignisse kann die Effizienz des Komplementangriffs gegen invasive Mikroorganismen erheblich vermindert werden. Überraschend ist, dass nur wenige mikrobielle Virulenzfaktoren bekannt sind, welche die Komplementkaskade direkt inhibieren [75]. Das Gram-positive Pathogen *Staphylococcus aureus* exprimiert das extrazelluläre fibrinogenbindende Protein (Efb), welches C3 bindet, eine Konformationsänderung herbeiführt und die Aktivierung der Komplementkaskade inhibiert [77, 78]. *S. aureus* nutzt außerdem den Staphylokokken-Komplementinhibitor (*staphylococcal complement inhibitor*, SCIN) zur Komplementevasion. SCIN bindet die C3-Konvertasen aller Aktivierungswege, stabilisiert diese, aber inhibiert zugleich deren Aktivität

[79]. *Borrelia burgdorferi* exprimiert ein oberflächenlokalisiertes CD59-ähnliches Protein, welches die Bildung des TCC durch Bindung an C8 und C9 inhibiert [80]. Ebenso fungiert auch der Streptokokken-Komplementinhibitor (*streptococcal inhibitor of complement*, SIC). SIC bindet an C5b-C7- sowie an C5b-C8-Komplexe und inhibiert dadurch die TCC Bildung [81].

Herpes-simplex-Viren nutzen Glykoproteine wie gC1 und gC2 um die Komplementkaskade zu stören. Diese binden C3b und beschleunigen dadurch den Zerfall der C3-Konvertase. Außerdem verhindert gC2 die Interaktion von C3b mit C5 sowie Properdin [82, 83]. Andere Glykoproteine der Herpes-simplex-Viren fungieren als Fc-Rezeptor. Sie binden die Schwere Kette von Immunglobulinen, sodass sie von C1q nicht länger erkannt und die Initiierung des CP inhibiert wird [82, 84]. Ähnliche Ig-bindende Proteine, wie das Staphylokokkenprotein A (SpA) und das Superantigenähnliche Protein 10 (*superantigen-like protein10*, SSL10) von *S. aureus* sowie Protein G von Streptokokken der Serogruppe G, sind ebenfalls von Bakterien bekannt [85-87]. Viren nutzen zudem inhibitorische Proteine, welche humanen Komplementregulatoren stark ähneln und ihre Funktion imitieren. *Orthopoxvirus vaccinia* und *variola* exprimieren beispielsweise Komplementkontrollproteine, welche Zerfallsbeschleunigungs- und Cofaktoraktivität besitzen [88, 89].

Die Parasiten der Gattungen *Schistosoma* und *Trypanosoma* exprimieren Proteine, welche die Interaktion zwischen C2 und C4 inhibieren und somit die Bildung der C3-Konvertase des CP blockieren [90]. Des Weiteren nutzen *Schistosoma* Paramyosin, um C8 und C9 zu binden und die Bildung des TCC zu stören [91].

1.3.2 Proteasen

Durch den Einsatz mikrobieller Proteasen spalten Pathogene Komplementkomponenten in inaktive Fragmente und inhibieren so die Effektorfunktionen der Komplementkaskade. Obwohl eine große Anzahl an Substraten solcher Proteasen bekannt ist, findet diese Form der Immunevasion fast ausschließlich bei Bakterien Verbreitung [75]. Elastase (PaE) sowie die alkalische Phosphatase (PaAP) von *P. aeruginosa* spalten beispielsweise Immunglobuline sowie C1q und inhibieren damit die Initiation des CP [87, 92]. Außerdem spalten PaE und PaAP, aber auch PrtH von *Porphyromonas spp.*, die zentrale Komplementkomponente C3 in inaktive Spaltprodukte und stören so die Komplementkaskade auf Ebene der C3-Konvertase [92, 93]. Das von Streptokokken der Serogruppe A produzierte, pyrogene Exotoxin B (SPE B) schneidet Properdin, welches in Folge seine stabilisierende Funktion für die AP-C3-Konvertase verliert [94]. Streptokokken der Serogruppen A und B sowie *Serratia marcescens* nutzen Proteasen außerdem, um C5a

in inaktive Fragmente zu spalten und damit dessen chemotaktische sowie proinflammatorische Funktion zu inhibieren [95, 96].

Der Parasit *Schistosoma mansoni* nutzt ein seltenes Beispiel einer nicht-bakteriellen Protease zur Inhibition der Komplementaktivität. Durch Degradation von iC3b reduziert er die Interaktion mit CR3 und damit komplementvermittelte Phagozytose [97].

1.3.3 Rekrutierung von humanen Komplementregulatoren

Komplementregulatoren auf der Oberfläche körpereigener Zellen inhibieren die Komplementkaskade auf verschiedenen Ebenen, um die Gefahr für Wirtszellen durch Komplementeffektorfunktionen zu minimieren. Nur so kann das Komplementsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen differenzieren [23]. Diesen Umstand nutzen mikrobielle Erreger. Um von der humanen Komplementantwort nicht erkannt zu werden, exprimieren Pathogene Proteine, welche im Blut zirkulierende Komplementregulatoren an ihre Oberfläche binden und inhibieren dadurch die Komplementaktivierung sowie etwaige Effektorfunktionen. Diese Strategie der Komplementevasion ist unter pathogenen Erregern weit verbreitet [18, 19, 98]. Begründet ist dies vermutlich dadurch, dass die humanen Komplementregulatoren vom Wirt selbst produziert werden und darum in hoher Konzentration vorliegen. Außerdem sind sie exakt auf ihre regulatorische Funktion abgestimmt und deshalb hoch spezialisiert. Darüber hinaus haben sie gemeinsame strukturelle Merkmale wie die SCR-Domänen, was einzelnen Virulenzfaktoren von Pathogenen ermöglicht, verschiedene Komplementregulatoren des Wirts zu rekrutieren [75]. Besonders häufig ist die Bindung der im Serum gelösten Komplementregulatoren C4BP, Faktor H und FHL-1 beschrieben, welche die Komplementkaskade auf Ebene der C3-Konvertase inhibieren. So exprimieren Streptokokken der Serogruppe A Proteine der M-Familie, welche C4BP binden [99, 100]. Ebenso fungieren die Porine Por1A und Por1B sowie der Typ-IV Pilus von *Neisseria gonorrhoeae*, die ubiquitären Oberflächenproteine A1 und A2 von *Moraxella catarrhalis*, das *outer membrane protein A* von *E. coli* K1 oder das Pneumokokkenoberflächenprotein C (PspC) von *Streptococcus pneumoniae* [87, 101-104]. Die Proteine der M-Familie von Streptokokken der Serogruppe A sowie die Porine von *N. gonorrhoeae* binden außerdem Faktor H [105, 106]. Das Beta-Protein von Streptokokken der Serogruppe B, YadA und Ail von *Yersinia enterocolitica* sowie Omp100 von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* erfüllen die gleiche Funktion [107-109]. Neben Faktor H binden Fba von Streptokokken der Serogruppe A, die *complement regulator acquiring proteins 1-2* (CRASP1-2) von *B. burgdorferi* sowie PspC und der Translationselongationsfaktor Tu (Tuf) von *S. pneumoniae* ebenfalls FHL-1 [110-113]. Zahlreiche Pathogene, wie unter anderem

Streptokokken der Serogruppen A, C und G, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *H. influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *P. aeruginosa* und *B. burgdorferi*, binden außerdem humanes Plasminogen. Durch humane Aktivatoren wie tPa und uPa wird Mikroben-gebundenes Plasminogen dann zur aktiven Protease Plasmin konvertiert, welche die zentrale Komplementkomponente C3b inaktiviert und somit die Komplementkaskade auf C3-Ebene inhibiert. Zudem exprimieren Streptokokken der Serogruppen A, C und G mit Streptokinase, *S. aureus* mit Staphylokinase und *Y. pestis* mit Pla mikrobielle Plasminogenaktivatoren und sind damit von humanen Aktivatoren unabhängig [114].

Neben löslichen Komplementregulatoren können auch membrangebundene Regulatoren durch pathogene Mikroorganismen genutzt werden. So rekrutieren *Helicobacter pylori* und *E. coli* humanes, GPI-verankertes CD59 von Wirtszelloberflächen und schützen sich durch Inhibition der TCC-Bildung vor komplementvermittelter Lyse [115, 116].

Auch der pathogene Pilz *Candida albicans* rekrutiert verschiedene Komplementregulatoren an seine Oberfläche, um der humanen Komplementantwort zu entgehen. *C. albicans* nutzt das pH-regulierte Antigen 1 (Pra1), um C4BP an seine Oberfläche zu binden. Des Weiteren exprimiert der Pilz diverse Oberflächenproteine, um Faktor H, FHL-1 und Plasminogen zu rekrutieren. Dazu gehören beispielsweise Phosphoglyceratmutase 1 (Gpm1), Glycerin-2-phosphat-Dehydrogenase (Gpd2) und Pra1 [117-120]. Auch die Konidien von *Aspergillus fumigatus* binden die Komplementregulatoren Faktor H, FHL-1 und Plasminogen an ihre Oberfläche, um die menschliche Komplementantwort zu stören [121].

Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) bindet Faktor H durch die Kapsidglykoproteine 41 und 120 (gp41 und gp120), um die Komplementkaskade auf der Oberfläche infizierter Zellen zu inhibieren [122].

Auch Parasiten nutzen humane Komplementregulatoren zur Komplementevasion. So exprimiert der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* GAP50, welches Faktor H sowie FHL-1 bindet. Außerdem nutzt der Parasit *P. falciparum* *reticulocyte binding homolog protein 4* (PfRh4), um CR1 zu binden. Dadurch wird nicht nur dessen Invasion humaner Erythrozyten unterstützt, es bleibt ebenfalls die Cofaktoraktivität von CR1 erhalten, was *P. falciparum* die Inhibition der Komplementkaskade ermöglicht [123, 124].

1.3.4 Zellwände und Polysaccharidkapseln

Neben der direkten Inhibition der Komplementkaskade, der Degradation von Komplementkomponenten oder der Bindung von Komplementregulatoren nutzen Mikroorganismen eine weitere, passive Strategie gegen Komplementangriffe. So schützen

dicke Zellwände oder Polysaccharidkapseln Pilze und Bakterien gegen die lytischen Eigenschaften des TCC. *C. albicans* besitzt eine dicke Zellwand, welche sich in eine äußere und eine innere Schicht gliedern lässt. Die äußere Schicht besteht zu großen Teilen aus an Proteine gekoppelten Mannosepolymeren, während die innere Schicht die Polysaccharide Chitin und β -1,3-Glucan enthält, welche eine Gerüstfunktion besitzen und die Zellstruktur stärken [125]. Diese dicke und komplexe Zellwand kann der ca. 16 nm tiefe TCC nicht penetrieren [126, 127]. Die Zellwand von Gram-positiven Bakterien besitzt eine 30-100 nm dicke Peptidoglycanschicht, welche der TCC ebenfalls nicht durchdringen kann. Einige Pathogene wie Streptokokken der Gruppen A und B, *S. aureus*, *E. coli* und *S. pneumoniae* können zudem eine Polysaccharidkapsel ausbilden, welche die Erkennung durch das humane Immunsystem erschwert und die Adhäsion an Epithelzellen des Wirts fördert. [128-131].

1.4 Gram-positive Bakterien

Bakterien werden im Laufe des Infektionsprozesses mit wechselnden und häufig feindlichen Milieus konfrontiert. Um das eigene Überleben zu sichern, entwickelten Mikroben komplexe Zellmembranen, welche sie schützen und dennoch einen effektiven Nährstofftransport ermöglichen. Im Jahre 1884 entwickelte Christian Gram eine Färbeprozedur, welche, in Abhängigkeit der Beständigkeit der Färbung, eine Differenzierung zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien ermöglicht [132].

Im Gegensatz zu Gram-negativen besitzen Gram-positive Bakterien nur eine Zellmembran. Diese ist allerdings von einer 30-100 nm dicken, aus vielen Ebenen bestehenden, Peptidoglycanschicht umgeben, welche die beständige Gram-Färbung bedingt [132]. Die Peptidoglykanebenen sind von Teichonsäuren durchzogen, welche hauptsächlich aus Glycerin-Phosphat-, Glycosyl-Phosphat- und Ribitol-Phosphat-Polymeren bestehen. Diese sind kovalent an Peptidoglykane gebunden. Eine Sonderstellung nehmen die Lipoteichonsäuren ein. Diese sind direkt an Kopfgruppen von Membranlipiden der Bakterien verankert [133]. Neben den Teichon- und Lipoteichonsäuren ist die Oberfläche Gram-positiver Mikroorganismen mit zahlreichen Proteinen versehen. Manche dieser Proteine besitzen Transmembranhelices. Andere sind durch Lipidanker befestigt, kovalent an Peptidoglykane sowie Teichonsäuren oder nicht-kovalent an Phosphatidylcholin gebunden (Abb. 4) [134].

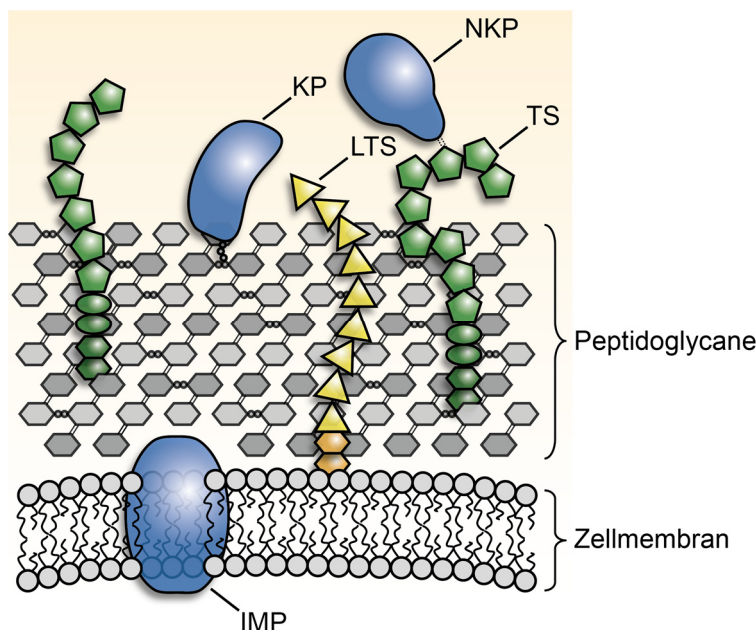


Abbildung 4: Der Zellwandaufbau Gram-positiver Bakterien

Die Zellmembran Gram-positiver Mikroorganismen ist von einer 30-100 nm dicken Peptidoglykanschicht umgeben. Teichon- sowie Lipoteichonsäuren (TS bzw. LTS) sind in die Peptidoglykanschicht integriert. Außerdem befinden sich zahlreiche Proteine auf der Oberfläche der Bakterien. Diese können integrale Membranproteine (IMP) sein oder sie sind an Komponenten der Zellwand gebunden, wie beispielsweise mittels LPxTG-Anker kovalent an Peptidoglykane (kovalent gebundene Proteine, KP) oder durch cholinbindende Motive nicht-kovalent an Teichon- und Lipoteichonsäuren (nicht-kovalent gebundene Proteine, NKP). Die Abbildung wurde nach [132] adaptiert.

1.5 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae (Pneumokokken) sind Gram-positive, alpha-hämolytische und fakultativ anaerobe Bakterien [135]. Pneumokokken sind von einer Polysaccharidkapsel umgeben. Aufgrund verschiedener, in der Kapsel inkorporierter Monosaccharide, unterschiedlicher Bindungen innerhalb der Polysaccharidketten und variierender Synthesenzyme, unterscheiden sich die Kapseln der Pneumokokken strukturell [136-138]. Zu diesem Zeitpunkt sind 94 verschiedene, kapselabhängige Serotypen von *S. pneumoniae* bekannt [139]. Pneumokokken werden durch Aerosole übertragen und kolonisieren den oberen respiratorischen Trakt von ca. 50 % der Kinder weltweit asymptomatisch. Dies schafft ein ausreichend großes Reservoir, um die Verbreitung von *S. pneumoniae* von Person zu Person zu ermöglichen [140]. Vor allem bei immunsupprimierten, alten oder sehr jungen Menschen können Pneumokokken verschiedene Krankheiten induzieren. Sie verursachen lebensbedrohliche Erkrankungen wie Pneumonie, Meningitis, Sepsis sowie hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) und sind dabei der am häufigsten detektierte Keim, als Ursache von ambulant-erworbener Pneumonie [141-143]. Des Weiteren sind Pneumokokkeninfektionen eine Hauptursache von Sinusitis und Otitis media [135, 144].

S. pneumoniae-assoziierte Krankheiten sind in Entwicklungs- wie in Industriestaaten weit verbreitet und bedingen jährlich weltweit mehr als 1,6 Millionen Todesfälle, davon allein 50 % bei Kindern im Alter von weniger als 5 Jahren. Damit verursachen Pneumokokken weltweit ca. 11 % aller Tode in der Kindheit [141, 144].

Aktuelle Strategien zur Bekämpfung von *S. pneumoniae*-Infektionen beschränken sich hauptsächlich auf Vakzinierung und antibiotische Behandlung. Gegen Pneumokokken entwickelte Impfstoffe richten sich gegen Polysaccharide der Bakterienkapsel und damit gegen bestimmte *S. pneumoniae*-Serotypen. Dabei unterscheidet man Konjugatimpfstoffe, bei denen die Polysaccharide der Kapsel an Trägerproteine gebunden werden, und Polysaccharidimpfstoffe, welche eine Mischung aus unkonjugierten Polysacchariden der Kapsel enthalten. Durch Einführung des *7-valent pneumococcal conjugate vaccine* (Prevnar®), welches gegen 7 verschiedene Serotypen wirkt, wurden asymptomatische Kolonisierungen und invasive Erkrankungen mit diesen Serotypen in vakzinierten wie unvakzinierten Personen drastisch reduziert [144-146]. In den vergangenen Jahren wurden zwei weitere Konjugatimpfstoffe eingeführt: das *10-valent pneumococcal conjugate vaccine* (Synflorix®) sowie das *13-valent pneumococcal conjugate vaccine* (Prevnar13®), welche drei beziehungsweise sechs zusätzliche Serotypen im Vergleich zu Prevnar® bekämpfen [147, 148]. Neben Konjugatimpfstoffen ist derzeit auch der Polysaccharidimpfstoff Pneumovax 23 in Gebrauch, welcher Kapselpolysaccharide von 23 unterschiedlichen Pneumokokkenserotypen enthält [149]. Die Vakzinierung gegen Pneumokokken birgt neben den offenkundigen Vorteilen allerdings auch Nachteile. So wird beispielsweise über das *serotype replacement*-Phänomen berichtet. Dabei kommt es zum gehäuften Auftreten bislang als nicht krankheitsassoziiert beschriebener Pneumokokkenserotypen, welche nicht durch die verschiedenen Impfstoffe bekämpft werden. Diese Serotypen führen dann zu einem Wiederaufleben Pneumokokken-assoziiierter Krankheiten in der Bevölkerung [150, 151].

Zur Behandlung akuter *S. pneumoniae*-Infektionen werden primär β -Lactam-, Makrolid- und Fluorchinolon-Antibiotika eingesetzt [152, 153]. Doch wie andere Pathogene entwickelten auch Pneumokokken in den vergangenen Jahren Antibiotikaresistenzen. Seit 1967 steigt die Häufigkeit β -Lactam-Antibiotika-resistenter Pneumokokken und ist nun weit verbreitet. In den USA wurde im Jahr 2004 bei 35 % aller *S. pneumoniae*-Isolate eine Penicillin-Resistenz festgestellt. In südeuropäischen Ländern steigt die Quote auf bis zu 50 %. Des Weiteren erhöht sich auch die Anzahl der Pneumokokkeninfektionen, welche nicht mit Makrolid- oder Fluorchinolon-Antibiotika therapiert werden können. Daraus folgend ist es wichtig, neue potentielle Ziele für medikamentöse Behandlungen von *S. pneumoniae*-assoziierten Erkrankungen aufzuklären. Diese sollten Virulenzfaktoren sein, die allen

Pneumokokkenserotypen gemein sind und eine effektive sowie selektive Therapie ermöglichen [144, 154-156].

1.5.1 Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*

Pneumokokken besitzen zahlreiche Virulenzfaktoren, welche häufig direkt mit Oberflächen des Wirts interagieren oder dazu dienen, *S. pneumoniae* vor der Immunantwort des Wirtsorganismus zu verbergen bzw. zu schützen. In der Vergangenheit betrachtete man die Polysaccharidkapsel als primären Virulenzfaktor der Pneumokokken. Vor allem deshalb, weil sich nicht bekapselte Bakterien im Vergleich zu bekapselten, isogenen Stämmen als deutlich weniger virulent erwiesen [128]. Die Kapsel besteht aus einer dicken Schicht Polysaccharide, welche kovalent an Peptidoglykane der bakteriellen Zellwand gebunden sind [157]. Die vorkommenden, durch glykosidische Bindungen verketteten Monosaccharidbausteine sind D-Glucose, D-Galactose, L-Rhamnose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin, N-Acetylmannosamin und Glucuronsäure [158]. Neben Polysacchariden besteht die Kapsel ebenfalls aus Nicht-Zuckerkomponenten wie Zellwandproteinen die sogar bis über die Kapsel hinaus ragen können. Die Polysaccharidkapsel der Pneumokokken dient als hydratisiertes Schild, welches die bakterielle Oberfläche vor einer Erkennung durch das Immunsystem des Wirts schützt. Außerdem hat sie anti-phagozytische Aktivität, da sie Opsonophagozytose inhibiert und die Detektion von auf der Zellwand abgelagertem C3b/iC3b stört. Die Kapsel fördert des Weiteren die Adhäsion von *S. pneumoniae* an Epithelzellen, damit das Überwinden epithelialer Barrieren und die Verbreitung des Bakteriums im Wirtsorganismus [128, 129].

Heutzutage ist bekannt, dass *S. pneumoniae* neben der Kapsel zahlreiche weitere, ebenfalls wichtige Virulenzfaktoren besitzt (Abb. 5). Die Zellwand der Pneumokokken enthält beispielsweise zahlreiche Proteine, welche die Immunevasion und Dissemination von *S. pneumoniae* im Wirtskörper unterstützen. Dazu gehören auch die cholinbindenden Proteine (Cbp), welche durch repetitive, cholinbindende Domänen nichtkovalent an Phosphatidylcholin der Zellwand gebunden sind [159]. Pneumokokken exprimieren 13 bis 16 verschiedene Cbp. Die Wichtigsten sind die vier Zellwandhydrolasen, N-acetyl-muramoyl-L-Alanin-Amidase (LytA), β -N-Acetylglucosamidase (LytB), β -N-Acetylmuramidase (LytC) sowie Phosphocholinesterase (*choline binding protein E*; CbpE), CbpD, CbpF, Pneumokokkenoberflächenprotein A (*pneumococcal surface protein A*, PspA) und Pneumokokkenoberflächenprotein C (*pneumococcal surface protein C*, PspC) [144, 159]. LytA und LytC fungieren als Autolysine. Sie induzieren die Lyse von Pneumokokken und entlassen damit andere Virulenzfaktoren oder Evasionsproteine in das Gewebe des Wirts [160, 161]. Außerdem tragen LytA und LytC durch Autolyse zum Phänomen des *cellular*

fracticide bei, wodurch die Häufigkeit des horizontalen Gentransfers mit verwandten Spezies erhöht wird. Dadurch vergrößert sich der gemeinsame Genpool und die Adaptionfähigkeit der Bakterien gegen Stressoren wie Vakzine oder Antibiotika wird erhöht [162-165]. LytA trägt weiterhin zum Phänomen des *capsule shedding* bei und kann damit die Invasivität der Pneumokokken erhöhen [166]. LytC beeinflusst zusätzlich die Biofilmbildung [167]. LytB spielt eine Rolle bei der Biofilmbildung sowie der Kolonisierung des Nasopharynx [167, 168]. CbpE spaltet Phosphatidylcholin von Teichon- und Lipoteichonsäuren ab und trägt damit zur Freisetzung von Virulenzfaktoren bei [169-171]. Außerdem wurde berichtet, dass das Entfernen von Phosphocholinresten die Oberfläche der Pneumokokken so modifiziert, dass CRP-Bindung reduziert und damit die Erkennung durch das Immunsystem des Wirts gestört wird [172]. CbpE beeinflusst die Kolonisierung des Nasopharynx und die Adhäsion an humane Epithelzellen [162]. Außerdem rekrutiert CbpE humanes Plasmin und unterstützt damit die Dissemination der Pneumokokken im Wirtsgewebe sowie deren Komplementevasion [43, 173]. Das cholinbindende Protein CbpD ist eine Mureinhydrolase und spielt wie LytA sowie LytC eine Rolle beim *cellular fracticide* [174]. CbpF ist eines der am häufigsten in der Pneumokokkenzellwand vorkommenden Proteine und fungiert als Regulator der LytC-Aktivität [175]. PspA interferiert mit der Komplementaktivierung. Außerdem bindet es Lactoferrin und verhindert die Apolactoferrin-vermittelte Schädigung der Pneumokokken [176-178].

Neben cholinbindenden Proteinen besitzt *S. pneumoniae* auch zahlreiche oberflächenlokalisierte Virulenzfaktoren, welche durch das für Gram-positive Mikroorganismen typische LPxTG-Motiv kovalent an Peptidoglykane der Zellwand gebunden sind. Zu diesen gehören auch die Neuraminidasen. Derzeit sind drei neuraminidasekodierende Gene bekannt: *nanA*, *nanB* und *nanC* [159]. Neuraminidase fungiert als Exoglykosidase und spaltet terminale Sialinsäuren von Glykanen wie Mucinen, Glykolipiden und Glykoproteinen auf der Oberfläche von Wirtszellen. Dadurch verändert Neuraminidase die Glykosylierungsmuster der humanen Zellen und eröffnet Pneumokokken neue Interaktionsmöglichkeiten mit Wirtszellrezeptoren. Damit spielt Neuraminidase eine wichtige Rolle bei der Kolonisierung von humanen Geweben [128, 179]. Außerdem greift Neuraminidase auch terminale Sialinsäuren von bei der Kolonisierung des Nasopharynx konkurrierenden Mikroorganismen wie *Neisseria meningitidis* an. Dadurch wird deren komplementvermittelte Phagozytose verstärkt, wodurch *S. pneumoniae* einen Vorteil bei der Kolonisierung ökologischer Nischen erlangt [180]. Hyaluronat-Lyase (Hyl) ist ein weiterer Virulenzfaktor, der mittels LPxTG-Motiv an die Oberfläche von *S. pneumoniae* gekoppelt ist. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse von Hyaluronan der extrazellulären Matrix (EZM) des Wirtsorganismus und unterstützt damit die Verteilung und Kolonisierung von Pneumokokken im Wirt [158, 181].

Auch Lipoproteine spielen eine Rolle als Virulenzfaktoren von Pneumokokken. Das Pneumokokkenoberflächenadhäsins A (*pneumococcal surface adhesin A*, PsaA) beispielsweise unterstützt Adhäsion und Kolonisierung von *S. pneumoniae* durch Bindung an den humanen Zellrezeptor E-Cadherin [182, 183].

Neben klassischen Oberflächenproteinen tragen ebenfalls *moonlighting* Proteine zur Virulenz von *S. pneumoniae* bei. Diese haben keine klassischen Merkmale von Oberflächenproteinen, sind aber dennoch auf der Pneumokokkenoberfläche nachweisbar. So fungiert der Pneumokokken-Adhärenz- und Virulenzfaktor A (PavA) als Adhäsins für Fibronektin und beeinflusst dadurch die Pathogenese von Pneumokokkeninfektionen [184, 185]. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Enolase wurden als Plasmin-bindende Proteine auf der Oberfläche von *S. pneumoniae* identifiziert. Dies ermöglicht den Pneumokokken die Proteaseaktivität von Plasmin zur Degradation der EZM zu nutzen und damit die Transmigration und Kolonisierung zu fördern [186-188]. Der Translationsfaktor Tu (Tuf) gehört ebenfalls zur Gruppe der *moonlighting* Proteine und beeinflusst die Virulenz von Pneumokokken multifunktionell [113].

Auch Proteine, welche nicht auf der Oberfläche von *S. pneumoniae* lokalisiert sind, beeinflussen deren Virulenz erheblich. So ist Pneumolysin (Ply) beispielsweise im Plasma lokalisiert und wird durch die Aktivität von LytA in die Umgebung der Bakterien sezerniert. Es gehört, wie andere Virulenzproteine verschiedener Gram-positiver Mikroorganismen, zur Familie der cholesterinabhängigen Zytolysine. Ply spielt vor allem in der frühen Pathogenese der Pneumokokkeninfektionen eine wichtige Rolle. Es ist zytotoxisch für bronchiale Epithelzellen, verlangsamt das Schlagen der Zilien und zerstört die Integrität der bronchialen Epithelschicht. Dadurch wird die Fähigkeit der Epithelzellen, Schleim vom niederen respiratorischen Trakt zu entfernen, eingeschränkt, wodurch die Ausbreitung einer Pneumokokkeninfektion begünstigt wird [189, 190]. Außerdem kann Ply im Verlauf einer Pneumonie alveolare Ödeme und Blutungen verursachen. Es zerstört die Alveolar-Kapillar-Grenze. Dadurch sammelt sich Blut in den Alveoli, wodurch die Nährstoffversorgung der dort persistenten Pneumokokken verbessert wird. Ihre Wachstumsrate steigt und die Penetration von *S. pneumoniae* durch Epithelium und Interstitium in die Blutbahn des Wirts wird beschleunigt. Ply inhibiert außerdem den *oxidative burst*, Chemotaxis und bakterizide Aktivität von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sowie die Produktion von Lymphokinen und Immunglobulinen [191].

Das Zusammenspiel der zahlreichen, oberflächenlokalisierten oder sekretierten Virulenzfaktoren ermöglicht *S. pneumoniae* die menschliche Immunantwort auf verschiedensten Ebenen zu stören und macht Pneumokokken deshalb zu einem gefährlichen Pathogen für den menschlichen Organismus.

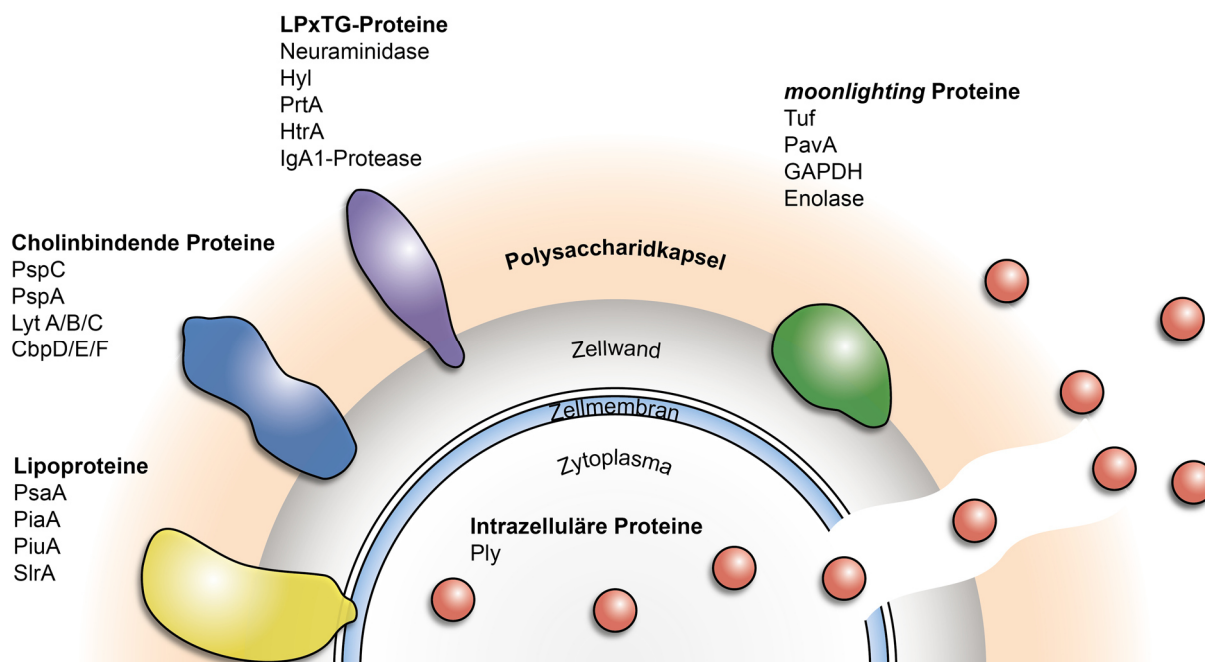


Abbildung 5: Überblick über die Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*

Pneumokokken besitzen neben der Polysaccharidkapsel zahlreiche Protein-Virulenzfaktoren. Man unterscheidet cholinbindende- und LPxTG-Proteine, Lipoproteine sowie *moonlighting* Proteine, welche auf unterschiedliche Art in der bakteriellen Zellmembran oder Zellwand verankert sind. Auch das intrazellulär-lokalisierte Protein Ply fungiert als Virulenzfaktor, nachdem es in die Umgebung der Pneumokokken gelangt. Für den Sezernierungsmechanismus von Ply spielt LytA eine Schlüsselrolle. Die Abbildung wurde nach [158, 159] adaptiert.

1.5.1.1 Translationselongationsfaktor Tu

Tuf wurde in verschiedenen Bakteriengattungen initial als zytoplasmatisches, hoch konserviertes, GTP-bindendes Protein identifiziert, welches mit der 50 S-ribosomalen Untereinheit assoziiert ist und in Prokaryoten eine wichtige Rolle bei der Translationselongation spielt [192-194]. Tuf bindet außerdem an Aminoacyl-tRNA und transportiert diese zu den Ribosomen. Es hat Chaperonaktivität und kontrolliert die Proteinfaltung sowie Renaturierung [195-197].

Tuf wurde neben seiner zytoplasmatischen Lokalisation auch auf der Oberfläche verschiedener Prokaryoten wie *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Mycobacterium leprae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Burkholderia pseudomallei*, *Lactobacillus johnsonii* und *S. pneumoniae* detektiert [113, 198-203]. Der Transport zur Membran erfolgt dabei unabhängig von Signalpeptiden und ist eher auf posttranslationale Modifikationen des Proteins zurückzuführen. Auch eine Sekretion des Proteins ist möglich, jedoch streng reguliert. Wie genau Tuf in die bakterielle Oberfläche integriert wird, ist noch unklar. Tuf stellt damit ein *moonlighting* Protein dar und erfüllt neben seinen intrazellulären Funktionen zusätzliche Aufgaben auf der Oberfläche oder in der unmittelbaren Umgebung der Bakterien [199, 204-207]. Tuf von *P. aeruginosa* und *S. pneumoniae* bindet Faktor H, FHL-1, CFHR1 und

Plasminogen. Dabei wird die Cofaktoraktivität von Faktor H und FHL-1 bewahrt. Außerdem kann Tuf-gebundenes Plasminogen zur aktiven Protease Plasmin konvertiert werden, sodass *P. aeruginosa* sowie *S. pneumoniae* die inhibierenden Funktionen der drei Komplementregulatoren ausnutzen können, um humane Komplementangriffe zu unterdrücken [113, 198].

1.5.1.2 Pneumokokkenoberflächenprotein C

Das Pneumokokkenoberflächenprotein C (PspC) ist ebenfalls bekannt als cholinbindendes Protein A (CbpA), C3-bindendes Protein A (PbcA), *S. pneumoniae*-IgA-bindendes Protein (SpsA) oder Faktor H-bindender Komplementinhibitor (Hic) [208-211]. PspC gehört zur Familie der cholinbindenden Proteine und weist strukturelle Ähnlichkeiten zu PspA auf. Analysen des *pspC*-Genlocus offenbarten große Allelvariationen zwischen unterschiedlichen *S. pneumoniae*-Stämmen. Daraus folgend kann das Molekulargewicht von PspC erheblich variieren. Basierend auf multiplen Sequenz-Alignments unterscheidet man zwischen elf unterschiedlichen Subgruppen von PspC-Isotypen [212, 213]. Diese haben vergleichbare Strukturen: ein N-terminales, 37 Aminosäuren langes Signalpeptid, gefolgt von einer multifunktionalen, hypervariablen Region, zwei repetitiven Regionen, einer prolinreichen Region sowie einem C-terminalen Bindungsmodul, welches die Verankerung in der Pneumokokkenoberfläche vermittelt (Abb. 6) [144, 212]. Anhand der Verankerung werden zwei Familien von PspC-Subgruppen unterschieden. Die Subgruppen der Isotypen 1-6 besitzen eine cholinbindende Region mit 7-13 repetitiven cholinbindenden Motiven. Diese sind typisch für cholinbindende Proteine. Deshalb werden diese PspC-Subgruppen auch als klassische PspC-Moleküle bezeichnet. Die Subgruppen der Isotypen 7-11 besitzen dagegen das LPxTG-Motiv, welches ebenfalls charakteristisch für viele Oberflächenproteine Gram-positiver Bakterien ist [212-214].

PspC ist ein multifunktionaler Virulenzfaktor und spielt eine Schlüsselrolle im Infektionsprozess von *S. pneumoniae*. Es fungiert als wichtiges Adhäsion und trägt zur Kolonisierung des Nasopharynx sowie der Lunge bei [208, 215]. PspC vermittelt außerdem die Invasion von Epithelzellen durch Bindung an die Sekretorische Komponente (*secretory component*, SC) von sekretorischem IgA (slgA) oder des humanen polymerischen Immunglobulinrezeptors (plgR). Dies ermöglicht *S. pneumoniae* die Immunglobulintranszytosemaschinerie der Wirtszellen auszunutzen, die humanen Mukosabarrieren zu überwinden und sich dann über die Blutbahn im Wirtsorganismus auszubreiten. Für die Rekrutierung von SC an PspC ist das Hexapeptid -(Y/R)RNYPT-verantwortlich, welches auch „Tyrosingabel“ genannt wird und in beiden repetitiven Regionen zu finden ist [210, 216-219]. PspC bindet außerdem an Lamininrezeptoren, welche ubiquitär

auf vaskulären Endothelzellen exprimiert werden und trägt damit ebenfalls zur Ausprägung invasiver Krankheiten wie Meningitis bei. Für diese Interaktion ist die hoch konservierte Erkennungssequenz -EPRNEEK- in der repetitiven Region 2 des PspC Moleküls verantwortlich [220].

Neben seiner Rolle als Adhäsion fungiert PspC außerdem als Immunevasionsprotein. PspC interagiert mit sIgA, welches eine wichtige Rolle für Immunreaktionen auf Schleimhäuten spielt. Durch PspC-vermittelte Bindung von sIgA kann die Beseitigung der Pneumokokken mittels Komplementreaktion oder Phagozyten inhibiert werden [144, 221]. PspC bindet außerdem Faktor H, den zentralen Inhibitor des AP. PspC-gebundenes Faktor H reduziert durch Cofaktor- und Zerfallsbeschleunigungsaktivität die Opsonisierung von *S. pneumoniae*, wodurch die Opsonophagozytose der Pneumokokken vermindert wird und folglich ihr Überleben im Wirtsorganismus verbessert [112, 222, 223]. Faktor H-Bindung ermöglicht außerdem eine raschere Bindung an und Internalisierung durch humane Epithelzellen, was einen zentralen Schritt für die Verbreitung von *S. pneumoniae* im menschlichen Körper darstellt [224]. Die PspC-Faktor H-Bindung wird durch das konservierte Motiv -ALNIKLASAIKTK- in der CbpAN-Domäne der hypervariablen Region des PspC-Moleküls ermöglicht, welches mit SCR 8-11 und SCR 19-20 von Faktor H interagiert [224-226]. Neben Faktor H bindet PspC weitere humane Komplementregulatoren wie Vitronektin und C4BP. Durch Rekrutierung von Vitronektin inhibieren Pneumokokken den terminalen Komplementweg, während C4BP-Bindung die Aktivierung des klassischen Komplementweges stört. Außerdem trägt die Vitronektin-PspC-Interaktion ebenfalls zur Bindung der Pneumokokken an und Internalisierung durch humane Epithelzellen bei und fördert damit die Verbreitung von *S. pneumoniae* im Wirt [104, 227]. Neben Komplementregulatoren bindet PspC auch C3 als zentrale Komponente der Komplementkaskade. Das ermöglicht *S. pneumoniae*, humanes C3 durch Degradation zu inaktivieren und damit die Bildung des Opsonins C3b sowie die eigene Opsonisierung zu inhibieren [228].

Durch die zahlreichen Funktionen als Adhäsion und Immunevasionsprotein stellt PspC einen der wichtigsten Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* dar.

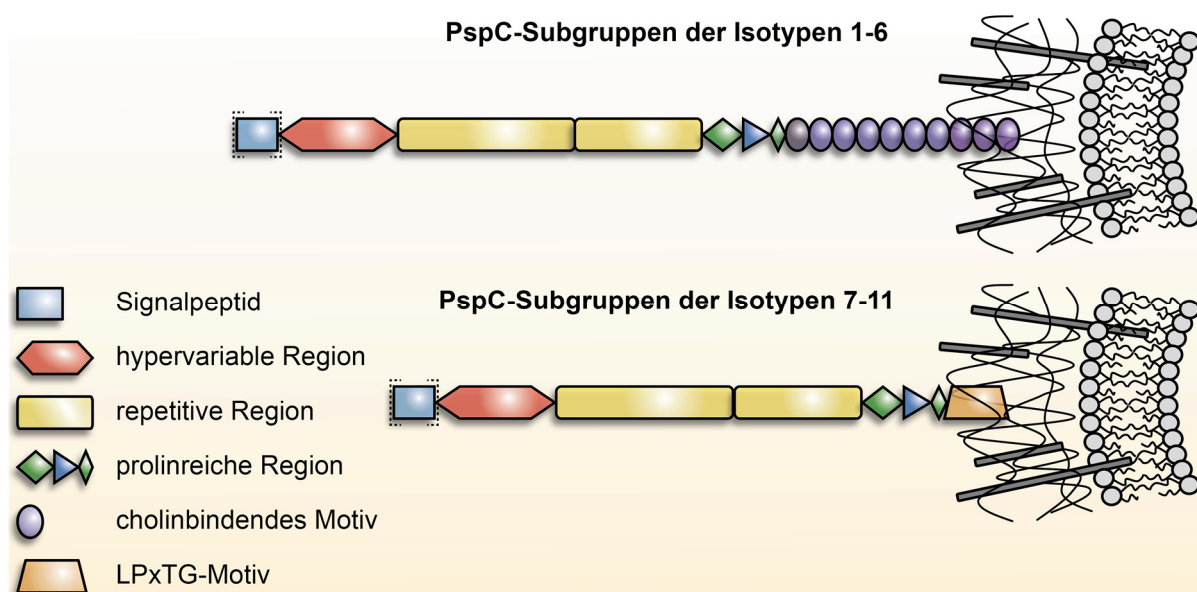


Abbildung 6: Die Struktur des polymorphen und multifunktionalen PspC

Man unterscheidet, basierend auf Sequenzanalysen, zwischen elf unterschiedlichen Subgruppen von PspC-Isotypen. Diese haben vergleichbare Domänenstrukturen: ein N-terminales Signalpeptid, eine multifunktionale, hypervariable Region, zwei repetitive Regionen, eine prolinreiche Region sowie eine C-terminale Oberflächenbindungsregion. Anhand der Verankerung in der Pneumokokkenoberfläche unterscheidet man zwei Familien von PspC-Subgruppen. Die Subgruppen der Isotypen 1-6 besitzen eine cholinbindende Region mit 4-13 repetitiven, cholinbindenden Motiven, während die Subgruppen der Isotypen 7-11 durch ein LPxTG-Motiv verankert sind. Die hypervariable Region beinhaltet das Faktor H-bindende Motiv, während in den beiden repetitiven Regionen je ein slgA-bindendes Motiv lokalisiert ist. Zusätzlich enthält die repetitive Region 2 eine Erkennungssequenz für humane Lamininrezeptoren.

1.6 Hämolytisch-urämisches Syndrom

Das Hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) ist eine schwerwiegende Nierenerkrankung, welche durch die Triade der Symptome mikroangiopathische, hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und akute Nierenschädigung charakterisiert ist [229]. Pathologisch ist HUS außerdem durch eine Verdickung der Blutgefäßwände, abgelöste Endothelzellen, Akkumulation von Proteinen und Zelltrümmer im subendothelialen Bereich, intraluminale Thromben und partielle oder komplette lumenale Obstruktion gekennzeichnet [229]. Dabei wird eine Schädigung des mikrovaskulären Endotheliums als primäres Ereignis zur Entstehung der Krankheit betrachtet. Diese führt zur Exposition subendothelialer Komponenten und induziert ein prothrombotisches Milieu [230, 231]. Je nach Auslöser des Endothelzellschadens unterscheidet man typisches HUS, atypisches HUS, DEAP-HUS und Pneumokokken-assoziiertes HUS (Abb. 7) [232, 233]. Die thrombotische Mikroangiopathie betrifft in erster Linie renale Mikrogefäße. Allerdings können auch Gehirn, Herz, Lunge und der Gastrointestinaltrakt betroffen sein [234].

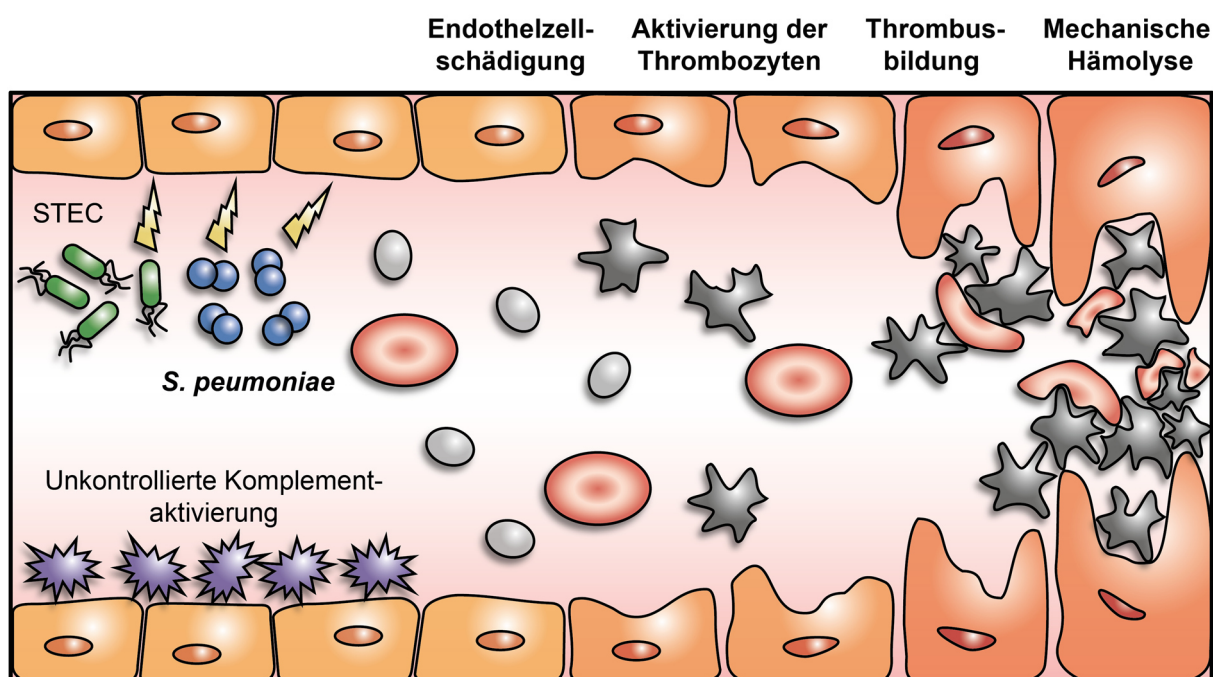


Abbildung 7: Die Pathogenese von HUS

Schädigung des mikrovaskulären Endotheliums ist das primäre Ereignis der Entstehung von HUS. In Abhängigkeit des Induktors der Endothelzellschädigung unterscheidet man verschiedene HUS-Subtypen. Typisches HUS wird durch Shiga-Toxin-produzierende *E. coli* (STEC) induziert, während Überaktivierung der Komplementkaskade aufgrund genetischer Defekte die Schlüsselrolle zur Ausbildung von atypischem HUS (aHUS) spielt. Bei der Entstehung von DEAP-HUS als Sonderform des aHUS sind Autoantikörper gegen Faktor H sowie Defizienzen für CFHR1 und CFHR5 von Bedeutung. Pneumokokken-assoziiertes HUS wird durch invasive *S. pneumoniae*-Bakterien induziert. Durch Integritätsstörung der Endothelzellen wird ein prothrombotisches Milieu gebildet, welches zur Aktivierung von Thrombozyten, Thrombusbildung, Gefäßobstruktion und Hämolyse führt. Die Abbildung wurde nach [235] adaptiert.

1.6.1 Typisches HUS

Typisches HUS entwickelt sich infolge einer gastrointestinalen Infektion mit Shiga-Toxin (Stx)-produzierenden *E. coli* (STEC) und wird deshalb auch als STEC-HUS bezeichnet. Es macht 90 % der HUS-Fälle weltweit aus [236]. Die globale Inzidenz liegt zwischen 0,2 und 4,28 Fällen in einer Population von 100000 Menschen [237]. Vor allem bei Kindern unter 5 Jahren ist die Häufigkeit von STEC-HUS erhöht [238]. *E. coli* O157:H7 ist das am häufigsten vorkommende STEC-HUS induzierende Pathogen [239]. STEC infizieren den Gastrointestinaltrakt, adhären an Epithelzellen und induzieren dort eine Inflammation. Die Bakterien exprimieren außerdem Stx, ein aus einer einzelnen A-Untereinheit (32 kDa) sowie fünf B-Untereinheiten (7,7 kDa) bestehendes Holotoxin (70 kDa) [240]. Man unterscheidet Stx-1 und Stx-2. Stx-2 produzierende *E. coli* sind virulenter als Stx-1 produzierende [241]. Durch Läsionen, über zelluläre Rezeptoren oder Phagozyten gelangt Stx vom Gastrointestinaltrakt in den Blutkreislauf [242]. Man vermutet, dass Stx durch Bindung an neutrophile Granulozyten bis zu den renalen Kapillarsystemen gelangt. Dort bindet es,

vermittelt durch seine B-Untereinheiten, an Globotriaosylceramid (Gb3) auf glomerulären Endothelzellen, welches eine 100-fach höhere Affinität für Stx hat als der neutrophile Stx-Rezeptor [243]. Anschließend wird das Toxin durch Endozytose von der Wirtszelle aufgenommen und retrograd zum endoplasmatischen Retikulum transportiert. Die Stx-Untereinheiten dissoziieren und die A-Untereinheit gelangt in das Cytosol. Dort inhibiert es enzymatisch die Proteinbiosynthese und induziert die Apoptose der Endothelzellen [244-247]. Neben seinen direkten Effekten auf die Endothelzellvitalität, interagiert Stx auch mit dem Komplementsystem. So induziert es die Expression von P-Selectin auf der Oberfläche der Endothelzellen und aktiviert damit die Komplementkaskade [248]. Des Weiteren interagiert Stx-2 mit Komplementregulatoren wie Faktor H, FHL-1 und CFHR1, stört deren Bindung an humane Zelloberflächen und reduziert damit deren schützende, komplementregulatorische Wirkung [249, 250].

Die Behandlung von STEC-HUS-Patienten ist problematisch. Liegt neben der Infektion des gastrointestinalen Trakts keine Bakteriämie vor, sollte eine antibiotische Behandlung vermieden werden, da dies zu einer vermehrten Ausschüttung von Stx führen kann [251, 252]. Unterstützende Therapien wie Plasmaaustausch, fibrinolytische Substanzen oder Thrombozytenaggregationshemmer sind während der akuten Phase von STEC-HUS ineffektiv [253]. Aktuelle Studien zeigen allerdings, dass Inhibitoren des Angiotensin-konvertierenden Enzyms einen förderlichen Effekt für die Langzeitprognose haben [254]. Bei Kindern mit typischen HUS und neurologischen Symptomen kann der frühe Einsatz von Eculizumab den neurologischen Krankheitsverlauf verbessern. Dieser humanisierte, gegen C5 gerichtete, monoklonale Antikörper inhibiert den TP der Komplementkaskade, reduziert die komplementvermittelte Endothelzellschädigung und stabilisiert so die Patientensituation [255]. Zudem ist bei STEC-HUS-Patienten eine Nierentransplantation möglich, da die Rezidivrate der Krankheit sehr niedrig ist [256].

1.6.2 Atypisches HUS

Als atypisches HUS (aHUS) bezeichnet man im klassischen Sinne HUS-Erkrankungen, die nicht auf STEC zurückzuführen sind. Aktuellere Auslegungen grenzen die Definition von aHUS auf Fälle ein, welche mit Dysregulation des Komplementsystems assoziiert sind [257]. Diese können auf familiäre oder sporadische genetische Defekte in Komplementregulatorgenen zurückzuführen sein [258, 259]. Hauptsächlich sind die Gene von Faktor H, MCP und Faktor I mit dieser Form von HUS assoziiert [260-263]. Des Weiteren wurden auch Mutationen in C3-, Faktor B- oder Thrombomodulin-Genen nachgewiesen. In ca. 12 % der aHUS-Patienten wurden Kombinationen aus zwei oder mehr dieser Mutationen detektiert. Ihnen allen ist gemein, dass sie zu einer Überaktivierung der

Komplementkaskade führen, was sich häufig in einer Reduktion der C3-Plasmakonzentration äußert und zur Schädigung der vaskulären Endothelzellen führt [234].

Die Behandlung von aHUS-Patienten steht in Abhängigkeit des mutierten Komplementregulators. Besonders bei zugrunde liegender Mutation von löslichen Komplementregulatoren wie Faktor H wird Plasmaaustausch zur Behandlung der Krankheit eingesetzt. Dadurch werden mutierte, nicht-funktionelle Komplementproteine durch intakte, aktive Regulatoren ersetzt und die fortlaufende, komplementvermittelte Endothelzellschädigung vermindert. Eine solche Therapie ist dagegen nicht sinnvoll, wenn die mutierten Regulatoren wie im Falle des MCP membrangebunden vorliegen [264-266]. Neben Plasmaaustausch werden auch Immunsuppressiva wie Eculizumab eingesetzt [267]. Bei aHUS-Patienten ist eine Nierentransplantation problematisch, da die Rezidivrate der Krankheit sehr hoch ist und zu Transplantatversagen führt [268].

Neben Mutationen in Komplementregulatorgenen kann, wie im Fall von DEAP-HUS, auch die Präsenz von Autoantikörpern gegen Faktor H zur Ausprägung von HUS führen.

1.6.3 DEAP-HUS

Deficient for CFHR proteins and Factor H autoantibody positive HUS (DEAP-HUS) ist eine Sonderform des aHUS, welche insbesondere junge Menschen im Alter von 3-17 Jahren betrifft. Die Patienten zeigen keine Anzeichen einer STEC-Infektion, sind aber positiv für Faktor H-Autoantikörper. Zudem sind die Patienten durch die homozygote Deletion eines 84 kb Genomfragmentes auf Chromosom 1q32 gekennzeichnet [252, 269]. Diese resultiert in dem Verlust der Gene für *CFHR1* und *CFHR3*. Dabei wird vermutet, dass die Ausbildung von Faktor H-Autoantikörpern auf den genetischen Hintergrund der *CFHR1/CFHR3*-Deletion zurückzuführen ist. Der genaue Zusammenhang ist noch ungeklärt [270]. Die Autoantikörper binden die C-terminale Oberflächenerkennungsregion SCR 18-20 von Faktor H, welche ebenfalls ein Hotspot für Mutationen bei aHUS darstellt und einen vergleichbaren Pathomechanismus vermuten lässt [271-273]. Die Bindung von Faktor H an humane Zellen wird inhibiert. Damit verliert Faktor H seine komplementregulierende Funktion auf Zelloberflächen, wodurch die Schädigung von Endothelzellen durch überschüssige Komplementaktivität induziert wird [232]. Zusätzlich fehlt der regulatorische Einfluss der beiden Komplementinhibitoren *CFHR1* und *CFHR3*, was ebenfalls zur komplementvermittelten Schädigung der Endothelzellen beiträgt [274].

DEAP-HUS-Patienten sprechen gut auf Plasmaaustausch und immunsuppressive Behandlung an, da die Autoantikörpertiter auf diese Weise langfristig reduziert werden können [232].

1.6.4 Pneumokokken-assoziiertes HUS

Eine invasive Infektion mit *S. pneumoniae* kann zur Ausprägung von HUS führen [275]. Man spricht dann von Pneumokokken-assoziiertem HUS (pHUS). Insgesamt macht pHUS 40 % aller nicht-STECHUS-Fälle aus. Kleinkinder unter 2 Jahren haben dabei die höchste Inzidenz [276, 277]. In der Regel entwickelt sich pHUS 3-13 Tage nach einer Infektion mit Pneumokokken. 65 %-92 % aller pHUS-Patienten haben eine Pneumonie, welche mit einem Empyem oder einem Pleuraerguss assoziiert ist [278-280]. Meningitis ist die zweithäufigste Ursache für die Ausbildung von pHUS, aber auch Bakteriämie, Perikarditis, Peritonitis oder Mastoiditis können in seltenen Fällen Auslöser sein [233, 276]. Im Vergleich zu STECHUS hat pHUS mit 2-12 % höhere Sterblichkeits- sowie mit 10-16 % höhere Langzeit-Morbiditätsraten [276, 278-280].

Bei der Ausprägung von pHUS ist ebenfalls das bereits beschriebene Phänomen des *serotype replacements* zu beobachten. Nach der Einführung von Prevnar® kam es beispielsweise zu einem dramatischen Anstieg der Häufigkeit von pHUS-Fällen, ausgelöst durch *S. pneumoniae*-Stämme, welche nicht durch das Vakzin abgedeckt wurden. Der Serotyp 19A wurde dabei, mit einer Inzidenz von 60-100 %, besonders häufig bei pHUS-Patienten festgestellt [276, 278].

Die exakte Pathogenese von pHUS ist unbekannt. Die verbreitetste Hypothese involviert das Thomsen-Friedenreich-Antigen (TFA). Dieses Antigen wird auf der Oberfläche von Erythrozyten, Thrombozyten, Glomeruli und Hepatozyten exprimiert und ist unter normalen Umständen durch Carbohydratreste verborgen. Wie bereits beschrieben, exprimieren Pneumokokken Neuraminidase. Mittels dieses Enzyms exponiert *S. pneumoniae* TFA durch Spaltung terminaler N-Acetylneuraminsäure von Glykoproteinen auf der Oberfläche humaner Zellen. Ist TFA freigelegt, so können bereits im Wirt vorhandene, spezifische IgM mit selbigem interagieren, was theoretisch zu Polyagglutination, Hämolyse, komplementvermitteltem Endothelzellschaden und dem pHUS Phänotyp führt [142, 233, 281]. Für die TFA-Theorie spricht, dass auch andere Neuraminidase-exprimierende Pathogene, wie *Capnocytophaga canimorsus* oder der Influenza-A-Virus die Ausprägung von HUS bedingen können [282, 283]. Allerdings gibt es auch gravierende Fakten, welche diese Theorie infrage stellen. So wird beispielsweise TFA-Exposition auch in Patienten detektiert, welche zwar eine Pneumokokkeninfektion haben, aber nicht an pHUS erkranken [284]. Des Weiteren ist TFA-IgM als so genannter *cold acting* Antikörper beschrieben. Es ist damit unwahrscheinlich, dass dieser Polyagglutination oder Komplementaktivierung induziert [285, 286].

Weitere Hypothesen der pHUS-Pathogenese involvieren Faktor H. Einerseits vermutet man, dass Neuraminidase-Aktivität die Bindung von Faktor H an wirtszelloberflächenlokalisierte C3-Konvertase inhibiert und damit Komplementaktivierung

sowie Zellschädigung induziert [287]. Andererseits zieht man in Betracht, dass PspC-vermittelte Faktor H-Bindung die Faktor H-Aktivität beeinträchtigt und es folglich zu Komplementdysregulation sowie Zellschäden kommt [107, 112].

Die Diagnose von pHUS ist aufgrund ähnlicher klinischer Symptome und Laborparameter mit disseminierter intravasaler Koagulopathie problematisch [276]. Generell wird eine Erkrankung als pHUS bezeichnet, wenn eine Pneumokokkeninfektion vorliegt, HUS-Symptome zu beobachten sind und thrombotische Mikroangiopathie mittels Biopsie nachweisbar ist [233]. Als Screening werden zudem der Coombs-Test sowie die *peanut lectin agglutination*-Methode eingesetzt. Der Coombs-Test dient dem Nachweis von auf der Erythrozytenoberfläche befindlichen Antikörpern und Komplementproteinen, während bei der *peanut lectin agglutination*-Methode die Exposition von TFA auf glomerulären Membranen sowie im Patientenserum detektiert wird [288-290].

Die Behandlung von pHUS-Patienten ist hauptsächlich unterstützend, durch Dialyse, Elektrolytausgleich und adäquate Diät [233]. Insofern keine Informationen zu spezifischen Sensitivitäten des infektiösen *S. pneumoniae* Stammes bekannt sind, wird eine Kombination aus Vancomycin und Cephalosporin als Antibiotikatherapie gegen die invasiven Pneumokokken empfohlen [291]. Plasmatransfusionen sollten vermieden werden, da man anti-TFA-IgM im Donorplasma vermutet, welches die Hämolyse theoretisch verstärken könnte [276, 278, 280]. Plasmaaustausch dagegen könnte eine Behandlungsmöglichkeit sein, da die Konzentration von möglicherweise pHUS induzierenden Faktoren, wie Neuraminidase und anti-TFA-IgM, im Patientenblutkreislauf reduziert wird. Allerdings gibt es zu dieser Therapiemethode nur limitierte Erfahrungsberichte, welche kontrovers diskutiert werden [233, 278]. In Anbetracht einer möglichen Dysregulation des Komplementsystems durch Inaktivierung von Faktor H, könnte auch eine Behandlung mit Eculizumab den Krankheitsverlauf bessern. Bei Nierenversagen von pHUS-Patienten wurden bereits erfolgreich Nierentransplantationen durchgeführt [279, 292].

1.7 Ziel des Promotionsprojektes

S. pneumoniae ist vor allem bei jungen Kindern, älteren und immunsupprimierten Menschen für hohe Sterblichkeits- und Morbiditätsraten zu verantworten. Um den humanen Organismus zu infizieren, muss das Pathogen Reaktionen des menschlichen Immunsystems und insbesondere dem Komplementangriff entkommen. Pneumokokken nutzen hoch entwickelte Strategien, um die Komplementkaskade auf unterschiedlichen Ebenen zu stören und ihr Überleben im Wirt zu sichern. Diese Strategien zu verstehen, ist der erste Schritt, um neue therapeutische Interventionen gegen Pneumokokken-assoziierte Krankheiten zu erforschen. Besonders vor dem Hintergrund der zunehmenden Inzidenz von Infektionen durch

antibiotikaresistente Pneumokokken wird die dringende Notwendigkeit des Aufklärens alternativer mikrobieller Ziele und Pathogenitätsmechanismen deutlich, um neue Strategien zur Bekämpfung von *S. pneumoniae*-Infektionen zu entwickeln.

Das Ziel dieses Projektes ist es, zwei klinische *S. pneumoniae*-Stämme, die von jungen pHUS-Patienten isoliert wurden, hinsichtlich ihrer Komplementevasion zu charakterisieren. Dazu soll die Rekrutierung der humanen Komplementregulatoren Faktor H und Plasminogen untersucht werden und zudem soll geprüft werden, ob die Pneumokokken-gebundenen Regulatoren ihre komplementinhibitorische Funktion bewahren. Des Weiteren soll die Oberflächenexpression der beiden Faktor H-bindenden Proteine Tuf und PspC der klinischen Isolate evaluiert werden. Relevante Biomoleküle sollen dann rekombinant exprimiert und hinsichtlich Faktor H- sowie Plasminogen-Bindung charakterisiert werden. Zudem soll die komplementregulatorische Aktivität der PspC-gebundenen Komplementinhibitoren analysiert werden, um zu untersuchen, in wie fern PspC die Komplementevasion der beiden klinischen Isolate beeinflusst. Um ein besseres Verständnis der pHUS-Pathogenese zu erlangen, ist es außerdem ein Ziel dieser Doktorarbeit, zu evaluieren, ob Faktor H- und Plasminogenrekrutierung zur Entstehung von pHUS beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer

Nachfolgend ist die Zusammensetzung der Puffer und Lösungen beschrieben, welche in der Doktorarbeit Verwendung fanden. Insofern nicht explizit ein anderes Lösungsmittel genannt ist, wurden diese mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt.

PBS II	140 mM NaCl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
	2,7 mM KCl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
	10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
	1,8 mM KH ₂ PO ₄ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
	pH 7,4

Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer	40 mM 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
	19,2 mM Essigsäure (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
	10 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA; pH 8,0) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
6x DNA-Ladepuffer	50 % Propan-1,2,3-triol (Glycerin) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
	0,05 % Bromphenolblau (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
	0,05 % Xylencyanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
	100 EDTA (pH 8,0)

SDS-PAGE

Trenngelpuffer	1,5 M Tris
	0,4 % Natriumdodecylsulfat (SDS) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
	pH 8,8
Sammelgelpuffer	500 mM Tris
	0,4 % SDS
	pH 6,8

SDS-Elektrophoresepuffer	2,5 mM Tris 19,2 mM Glycin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 0,1 % SDS
Silberfärbung	
Fixierlösung	30 % Essigsäure 30 % Ethanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Spüllösung	20 % Ethanol
Na ₂ S ₂ O ₃ -Lösung	0.2 g/l Na ₂ S ₂ O ₃ (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
AgNO ₃ -Lösung	2 g/l AgNO ₃ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
NaCO ₃ -Lösung	80,98 g/l NaCO ₃ x 10 H ₂ O (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Entwicklerlösung	47,5 ml NaCO ₃ -Lösung 2,5 ml Na ₂ S ₂ O ₃ -Lösung 35 µl Formaldehyd (37 %) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Stopplösung	50 g/l Tris 2,5 % Essigsäure
Western Blot	
Transferpuffer	15 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 0,1 % SDS
Blockpuffer	1 % BSA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 4 % Milchpulver (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 0,05 % Tween 20 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in 1x PBS II
Waschpuffer	0,05 % Tween 20 in 1x PBS II
ELISA	
Immobilisierungspuffer	1x DPBS
Blockpuffer	<i>Blocking buffer I</i> (PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Waschpuffer	0,05 % Tween 20 1x PBS II
Primärantikörperlösung	<i>Cross-down-buffer</i> (PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Entwicklerlösung	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) (eBioScience, Frankfurt am Main, Deutschland)
Stopplösung	2 M H ₂ SO ₄ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Durchflusszytometrie	
Waschpuffer	0,5 % BSA in 1x PBS II
Proteinaufreinigung	
Lysepuffer	50 mM Tris 100 mM NaCl 0,5 mM EDTA (pH 8,0) 0,5 % Triton X-100 0,1 mM NaN ₃ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 1x <i>Complete</i> 1 mM Dithiothreitol (DTT) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Ultraschallpuffer	100 mM Tris 50 mM Glycin
Dispersionspuffer	100 mM Tris 50 mM Glycin 8 M Harnstoff (PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) 5 mM L-Glutathion (GSH) (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Deutschland) 0,5 mM L-Glutathion-Disulfid (GSSG) (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Deutschland)
Bindungspuffer	0,01 M Tris 0,1 M NaH ₂ PO ₄ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 8 M Harnstoff
Waschpuffer	0,01 M Tris 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 8 M Harnstoff 25 mM Imidazol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Elutionspuffer	0,01 M Tris 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 8 M Harnstoff 250 mM Imidazol

ÄKTA-Waschpuffer	0,02 M Tris HCl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 0,5 M NaCl 0,02 M Imidazol 6 M Harnstoff 0,001 M 2-Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg, Deutschland) pH 8,0
ÄKTA-Rückfaltungspuffer	0,02 M Tris HCl 0,5 M NaCl 0,02 M Imidazol 0,001 M 2-Mercaptoethanol pH 8,0
ÄKTA-Elutionspuffer	0,02 M Tris HCl 0,5 M NaCl 0,5 M Imidazol 0,001 M 2-Mercaptoethanol pH 8,0

Phagozytoseassay

Lysepuffer	150 mM NH ₄ Cl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 10 mM KHCO ₃ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 10 mM EDTA pH 7,4
Dextranlösung	3 % Dextran T500 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 0,9 % NaCl pH 7,4
Färbelösung	2 nM <i>BacLight™ Green Bacterial Stain</i> (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) in DPBS

Plasmin vermittelte Spaltung von S-2251

Reaktionspuffer	64 mM Tris 80 mM NaCl 3*10 ⁻³ % Triton X-100
-----------------	---

Adhäsion von Pneumokokken an HUVEC

Färbelösung	2 nM <i>BacLight™ Green Bacterial Stain</i> in DPBS
-------------	--

Einfluss von Pneumokokken-gebundenem Plasmin auf die Vitalität von HUVEC

Färbelösung I	0,4 mg/ml Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Deutschland) 0,1 M NaCO ₃ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 0,15 M NaCl pH 9
Färbelösung II	10 µg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Deutschland) 10 µg/ml <i>wheat germ agglutinin</i> (WGA) <i>Texas Red</i> (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) in DMEM (Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland)

Bakterienkultur

<i>Luria-Bertani</i> -Medium (LB)	10 g/l <i>Bacto-Tryptone</i> (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 5 g/l <i>Bacto-Yeast</i> (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 10 g/l NaCl pH 7,5
LB-Agar	10 g/l <i>Bacto-Tryptone</i> 5 g/l <i>Bacto-Yeast</i> 10 g/l NaCl 20 g/l Agar pH 7,5

2.1.2 Proteine, Sera und Antikörper

Alle für diese Doktorarbeit genutzten rekombinanten Proteine, Sera und Antikörper sowie deren Herkunft sind nachfolgend benannt.

Tabelle 3: Rekombinante Proteine

Protein	Herkunft
PspC6 PspC3 Tuf	} Abteilung Infektionsbiologie, HKI, Jena, Deutschland
SH2	
	Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, Deutschland

Tabelle 4: Antikörper und Antisera

Antikörper/Antiserum	Klonalität	Wirt	Herkunft
α -C3	Antiserum	Ziege	Complement Technology Inc., Tyler, USA
α -C3d	mAK	Maus	Quidel, San Diego, USA
α -Faktor H (T13)	mAK	Maus	Abteilung Infektionsbiologie, HKI, Jena, Deutschland
α -Faktor H	Antiserum	Ziege	Complement Technology Inc., Tyler, USA
α -Fibrinogen	Antiserum	Ziege	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Deutschland
α -penta-His	mAK	Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
α -Plasminogen GTX79688	mAK	Maus	GeneTex, Irvine, USA
α -Plasminogen	Antiserum	Ziege	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
α -SH2	Antiserum	Kaninchen	Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, Deutschland
α -Tuf	Antiserum	Kaninchen	Abteilung Infektionsbiologie, HKI, Jena, Deutschland
α -Maus-IgG (HRP-konjugiert)	pAK	Ziege	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
α -Ziegen-IgG (HRP-konjugiert)	pAK	Kaninchen	
α -Kaninchen-IgG (HRP-konjugiert)	pAK	Ziege	
α -Maus-IgG (Alexa Fluor® 647-konjugiert)	pAK	Esel	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
α -Ziegen-IgG (Alexa Fluor® 647-konjugiert)	pAK	Kaninchen	
α -Kaninchen-IgG (Alexa Fluor® 647-konjugiert)	pAK	Ziege	

2.1.3 Primer

In der nachfolgenden Tabelle sind die Primer aufgelistet, welche für diese Doktorarbeit von Relevanz waren. Alle eingesetzten Primer wurden im Auftrag des HKI von der Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 5: Primer

Primer	Ziel	Sequenz
PspC_2R F07 (fwd)	<i>pspC</i>	GGATCCTTGTTTGCATCAAAAAGCGAAAG
PspC_2R F08 (rev)	<i>pspC</i>	AAGCTTGTTTAGTTTACCCATTACCATTTG
Tuf_fwd (fwd)	<i>tuf</i>	CACCATGGCAAAAGAAAAATACGATCGTAG
Tuf_rev (rev)	<i>tuf</i>	TTAAGCTTCGATTTCTGTAACCATACCTGA

2.1.4 Bakterienstämme

In der nachfolgenden Tabelle sind alle Bakterienstämme sowie deren Herkunft gelistet, mit denen in dieser Doktorarbeit gearbeitet wurde.

Tabelle 6: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Herkunft
<i>E. coli</i> One Shot® BL-21 Star™	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
<i>S. pneumoniae</i> D39	} Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, Deutschland
<i>S. pneumoniae</i> D39Δ <i>pspC</i>	
<i>S. pneumoniae</i> klinisches Isolat A (Sp _{HUS} A)	} Universitätsspital, Zürich, Schweiz
<i>S. pneumoniae</i> klinisches Isolat B (Sp _{HUS} B)	

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienkultur

2.2.1.1 *S. pneumoniae* Kultur

Arbeiten mit *S. pneumoniae* wurden stets unter sterilen Bedingungen (HERAsafe™ KS9, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) durchgeführt.

Die Pneumokokken wurden auf Schafblutagarplatten (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) über Nacht bei 37°C und in 5 % CO₂ Atmosphäre angezogen (INCO 153, Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland). Zur Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen bei 600 nm Wellenlänge (OD₆₀₀) wurde ein BioPhotometer® (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) genutzt. Ein OD₆₀₀-Wert von 1,0 entspricht dabei 10⁹ Pneumokokken pro ml Medium.

2.2.1.2 *Escherichia coli* Kultur

Arbeiten mit *E. coli* wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

E. coli wurde auf LB-Agarplatten oder in LB-Medium bei 37°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 180 rpm geschüttelt (New Brunswick™ Innova® 44/44R, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland). Zur Selektierung der *pspC*-transgenen Mutanten wurde das Nährmedium mit 50 µg/ml Kanamycin (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Deutschland) supplementiert.

2.2.2 Hitzeinaktivierung von normalem humanen Serum

Als normales humanes Serum (NHS) wurde ein Serumpool von 12 gesunden Spendern genutzt. Alle Spender gaben nach Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis. Die durchgeführten Studien wurden von dem Ethikkomitee der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt.

Zur Inaktivierung der Komplementaktivität wurde das NHS für 30 min bei 56°C und 400 rpm inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland).

2.2.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Um die Bindung von humanen Serumproteinen an *S. pneumoniae* oder PspC der klinischen Pneumokokkenisolate zu untersuchen, wurden ELISAs durchgeführt. Des Weiteren wurde die Tuf- und PspC-Oberflächenexpression verschiedener *S. pneumoniae* Stämme mittels ELISA analysiert. Als Mikrotiterplatten fungierten ELISA-Platten *High Binding F* (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland).

2.2.3.1 Protein-ELISA

Die zu untersuchenden Proteine wurden in 100 µl ELISA Immobilisationspuffer auf die Oberfläche von Mikrotiterplatten aufgebracht. Tuf, PspC und PspC-Fragmente wurden in äquimolaren Konzentrationen von 60 nM eingesetzt, um deren Bindungseigenschaften vergleichen zu können. Als Negativkontrollen wurden 5 µg/ml eines Proteins eingesetzt, welches nicht mit dem zu untersuchenden Liganden interagiert. Die Immobilisation erfolgte ü. N. bei 4°C. Die proteinhaltigen Vertiefungen wurden mit ELISA Waschpuffer gespült. Freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation von 200 µl ELISA Blockpuffer pro Vertiefung für 1 h bei RT abgesättigt. Anschließend wurden die Vertiefungen erneut gewaschen. Als Ligand fungierten 5 µg/ml des Proteins von Interesse, gelöst in DPBS. Anstelle von Proteinliganden wurde in entsprechende Kontrollvertiefungen lediglich DPBS pipettiert, welche als Antikörperkontrolle fungierten und die Wechselwirkung der eingesetzten Antikörper mit den immobilisierten Proteinen widerspiegeln. Nach Inkubation über 1 h bei RT wurden die Vertiefungen gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Primärantikörperlösung pro Vertiefung hinzugegeben. Die Antikörper wurden 1:1000 verdünnt. Nach 1 h Inkubation bei RT wurden die Mikrotiterplatten erneut gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Sekundärantikörperlösung mit 1:2500 verdünnten, HRP-konjugierten Sekundärantikörpern in jede Vertiefung wurden die Mikrotiterplatten nach 1 h Inkubation bei RT inkubiert und anschließend gewaschen. Dann wurden 100 µl der Entwicklerlösung pro Vertiefung

hinzugegeben. Die HRP-induzierte Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Stopplösung pro Vertiefung beendet. Der Umsatz des Substrats wurde mittels eines Mikrotiterplattenlesegerätes (safir², Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bestimmt, welches in jeder Vertiefung die Absorbanz der Lösung bei 450 nm Wellenlänge bestimmte.

2.2.3.2 *Whole cell*-ELISA

Bei den *Whole cell*-ELISAs wurden Pneumokokken in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte immobilisiert. Dazu wurden die Bakterien wie bereits beschrieben ü. N. auf Schafblutagarplatten kultiviert. Die Kolonien wurden dann mittels DPBS vom Agar abgespült. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für 3 min bei 13000 rcf zentrifugiert und das erhaltene Pellet erneut in 1 ml DPBS gewaschen. Durch Messung der OD₆₀₀ wurde die Zellzahl der Pneumokokkensuspension ermittelt. Anschließend wurden 100 µl entsprechend $2 \cdot 10^8$ Bakterien in jede Vertiefung eingebracht. Die Immobilisation erfolgte für 1 h bei 37°C. Alle nachfolgenden Schritte wurden, wie bereits in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben, durchgeführt.

Die ELISAs zur Analyse der Tuf- und PspC-Oberflächenexpression unterschiedlicher Pneumokokkenstämme wurden nach dem Protokoll des *Whole cell*-ELISAs durchgeführt. Nach dem Blocken ungesättigter Bindestellen der Mikrotiterplattenvertiefungen und dem darauffolgenden Waschschrift, wurde allerdings anstelle eines Liganden direkt Tuf- oder PspC-spezifisches Antiserum 1:1000 verdünnt in Primärantikörperpuffer eingesetzt. In den Antikörperkontrollen wurde kein Primärantikörper zugesetzt. Alle nachfolgenden Schritte wurden wie bereits beschrieben durchgeführt.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Um die Bindung von humanen Serumproteinen an Pneumokokken sowie die Tuf- und PspC-Oberflächenexpression verschiedener *S. pneumoniae*-Stämme zu untersuchen, wurde Durchflusszytometrie durchgeführt.

$2 \cdot 10^8$ gewaschene Pneumokokken einer ü. N.-Kultur wurden in einer Lösung aus in Waschpuffer verdünntem Liganden resuspendiert. Als Negativkontrollen fungierten Proben, zu denen kein Ligand hinzugegeben wurde. Sie dienten zur Detektion unspezifischer Wechselwirkungen der verwendeten Antikörper mit den Pneumokokken. Es folgte eine Inkubation über 1 h bei 37°C und 400 rpm. Anschließend wurden die Proben mit Waschpuffer gewaschen und die Bakterien in einer Lösung spezifischer Primärantikörper resuspendiert. Die aufgereinigten Immunglobuline oder Antisera wurden in Waschpuffer verdünnt. Sollten die Proteine Tuf und PspC auf der Oberfläche von Pneumokokken detektiert werden, fungierten Proben denen kein Primärantikörper zugesetzt wurde als

Antikörperkontrolle. Sie dienten zur Detektion unspezifischer Wechselwirkungen des verwendeten Sekundärantikörpers mit den Pneumokokken. Es folgte eine Inkubation über 1 h bei 37°C und 400 rpm. Nachfolgend wurden die Proben gewaschen. Nach Entfernen des Überstands wurde das Bakterienpellet in einer Lösung spezifischer, Alexa Fluor® 647-konjugierter Sekundärantikörper resuspendiert. Diese wurden 1:400 in Waschpuffer verdünnt. *CellTrace™ Calcein Violet* (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) wurde in einer Verdünnung von 1:500 hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT und 400 rpm in Dunkelheit wurden die Proben gewaschen. Die Bakterien wurden abschließend in Waschpuffer resuspendiert und die Fluoreszenzsignale von 10000 lebenden Bakterien wurden mittels Durchflusszytometer (LSRII, BD, Heidelberg, Deutschland) quantifiziert. Zur Berechnung der Fluoreszenzmediane (*median fluorescence intensity* MFI) sowie zur Visualisierung der Messergebnisse wurde die Software FlowJo 7.2.5 (FLOWJO LCC., Ashland, USA) verwendet.

2.2.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine hinsichtlich ihres Molekulargewichtes zu untersuchen, wurden SDS-PAGEs durchgeführt. 10 %ige Acrylamidgele wurden nach folgender Zusammensetzung hergestellt.

Tabelle 7: Bestandteile von zwei 10 %igen SDS-Gelen

Bestandteil	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid [ml]	5,0	0,65
Trenngelpuffer [ml]	3,75	-
Sammelgelpuffer [ml]	-	1,25
ddH ₂ O [ml]	6,25	3,0
10 % APS [μl]	50	25
TEMED [μl]	10	5

Acrylamid und TEMED wurden von Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) und APS von Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland) bezogen.

Zur Denaturierung der proteinhaltigen Proben wurden diese mit *Roti®-Load 1* (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) Probenpuffer versetzt und anschließend für 5 min bei 98°C inkubiert. Die Acrylamidgele wurden in eine Laufkammer (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt und mit proteinhaltigen Proben beladen. Die Laufkonditionen der Gelelektrophorese waren 150 V und eine variable Stromstärke. Als Molekulargewichtsstandard wurde *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) verwendet.

2.2.6 Silberfärbung

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Gel in eine Entwicklerkammer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) mit 50 ml Fixierlösung überführt. Nach 30 min Inkubation bei RT und 50 rpm (3012, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) wurde die Fixierlösung gegen 50 ml Spüllösung ausgetauscht. Es folgte eine Inkubation für 10 min. Anschließend wurde die Spüllösung verworfen und durch 50 ml ddH₂O ersetzt. Nach 10 min wurde das ddH₂O verworfen. Anschließend inkubierte das Gel 1 min bei 50 rpm in 45 ml Na₂S₂O₃-Lösung. Nachfolgend wurde es zwei Mal für jeweils 20 s mit ddH₂O gewaschen und inkubierte dann 30 min in 50 ml AgNO₃-Lösung. Anschließend wurde das Gel erneut zwei Mal 20 s mit ddH₂O gewaschen. Die Silberfärbung der Banden wurde durch Zugabe der Entwicklerlösung initiiert. Um die Färbung zu stoppen, wurde die Entwicklerlösung verworfen und durch 50 ml Stopplösung ersetzt. Vor der Trocknung des Gels wurde dieses in ddH₂O gewaschen. Zwei Cellophanfolien (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurden für 2 min bei RT in ddH₂O equilibriert und dann mit dem silbergefärbten Gel in einem Trocknungsrahmen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) zusammengesetzt. Nach dem Trocknen wurde das Gel mittels Scanner (Scanjet 4890, HP Deutschland GmbH, Böblingen) digitalisiert.

2.2.7 Western Blot

Sechs *Whatman*-Filterpapiere (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurden in Western-Transferpuffer und eine Nitrozellulosemembran (Amersham™ Protran™ 0,2 µm NC, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany) in ddH₂O equilibriert. Das SDS-Gel wurde in ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden, beginnend von der Anode, drei *Whatman*-Filterpapiere, Nitrozellulosemembran, SDS-Gel und noch einmal drei *Whatman*-Filterpapiere in einer Semi-Dry-Blotkammer (Trans-Blot Turbo®, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) zusammengesetzt. Als Basisprotokoll für den Proteintransfer wurde über 30 min eine Spannung von 12 V und eine Stromstärke von 1 A angelegt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in Western Blot Blockpuffer überführt und inkubierte bei 50 rpm ü. N. bei 4°C. Nachfolgend wurde die Membran in Western Blot Blockpuffer mit Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 überführt. Nach 1 h Inkubation bei RT und rollend (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Vereinigtes Königreich) wurde die Membran 1 h in Waschpuffer I gewaschen. Anschließend wurde der Waschpuffer I durch Western Blot Blockpuffer mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:2500 ersetzt. Es folgte eine Inkubation von 1 h bei RT und rollend. Die Nitrozellulosemembran wurde danach erneut 1 h bei RT gewaschen. Zur Entwicklung wurde das *CheLuminate-HRP PicoDetect kit* (PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt,

Deutschland) genutzt. Die Entwicklerlösung wurde auf die Nitrozellulosemembran aufgebracht. Nach 1 min wurde überschüssige Flüssigkeit entfernt. Die Chemilumineszenzsignale wurden mittels eines Chemilumineszenzkamerasystems (Fusion-FX7, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland) detektiert.

2.2.8 Aufreinigung der Membranproteinfraktion von *S. pneumoniae*

$2 \cdot 10^9$ Pneumokokken einer ü. N.-Kultur wurden gewaschen und in 20 µl DPBS resuspendiert. Um die Bakterien zu lysieren, wurden diese 100 s mit Ultraschall behandelt. Für alle weiteren Arbeitsschritte wurden die Proben, wenn nicht anders erwähnt, auf Eis gelagert. Nach 10 min Zentrifugation bei 400 rcf und 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 20 min bei 15000 rcf und 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet enthielt die Membranproteinfraktion (MP) und wurde in 50 µl DPBS resuspendiert. Nach Denaturierung wurden die proteinhaltigen Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die Präsenz von Tuf und PspC untersucht.

2.2.9 Isolation genomischer DNA von *S. pneumoniae*

Zur Sequenzierung der *tuf*- und *pspC*-Gene verschiedener Pneumokokkenisolate wurde die genomische DNA der betreffenden *S. pneumoniae* Stämme extrahiert. Dafür wurde das *GenElute™ Bacterial genomic DNA Kit* (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Deutschland) genutzt.

Zunächst wurden 1,5 ml Pneumokokken-Flüssigkultur in der *mid-Log-Phase* für 2 min bei 14000 rcf zentrifugiert (Centrifuge 5414, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland). Das Zellpellet wurde in 200 µl lysozym- ($2,115 \times 10^6$ Units/ml) (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Deutschland) und mutanolysinhaltiger (250 Units/ml) (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Deutschland) Lösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 37°C (Thermomixer comfort, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) wurden 20 µl Proteinase K (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Deutschland) und 200 µl *Lysis solution C* hinzugegeben. Die Proben wurden 15 s mittels eines Schüttlers (VF2, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) durchmischt und inkubierten dann 10 min bei 55°C. Nach 10 min bei 55°C wurden 200 µl Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zu den Proben hinzugegeben. Diese wurden dann 15 s lang durchmischt und auf Miniprep-Säulen geladen. Nach Zentrifugieren für 1 min bei 6.500 rcf wurde die Säule mit 500 µl *Wash solution 1* versetzt. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden 200 µl 70°C temperiertes ddH₂O auf die Säule aufgebracht. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde diese

dann bei 6500 rcf 1 min lang zentrifugiert, um die genomische DNA zu eluieren. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde ein Nanodrop-Messgerät (ND-1000 Spectrometer, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) genutzt.

2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion

Um spezifische Gene oder Genabschnitte eines DNA-Moleküls zu amplifizieren wurde PCR (englisch: *polymerase chain reaction*) durchgeführt. Für jeden PCR-Versuch wurde ein Mastermix hergestellt, welcher sich aus den nachfolgend genannten Komponenten zusammensetzt.

Tabelle 8: Bestandteile des PCR-Mastermixes

Bestandteil	Volumen pro Probe [µl]
ddH ₂ O	13,25
HE-Puffer	5,00
dNTPs	0,50
Vorwärtsprimer (2 µM)	2,50
Rückwärtsprimer (2 µM)	2,50
<i>Phusion® High Fidelity DNA-Polymerase</i>	0,25

HE-Puffer, dNTPs sowie *Phusion® High Fidelity DNA-Polymerase* wurden von der New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen. 24 µl dieser Lösung wurden mit 1 µl der DNA-Probe (50 ng/µl) in einem PCR-Reaktionsgefäß vereinigt. Dieses wurde dann in den *PCR thermocycler* (epgradient S, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) überführt. Das für diese Studien genutzte Standardprogramm für die DNA-Amplifikation ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 9: PCR-Standardprogramm

Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit [min, s]
Initiale Denaturierung	98	2,30
Denaturierung	98	0,10
<i>Annealing</i>	55-60	0,20
Primerhybridisierung	72	2,00
Finale Elongation	72	5,00
Lagerung	4	∞

2.2.11 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse der Länge und Reinheit von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten wurde Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Zur Herstellung der Agarosegele wurde 1 % *NEEO ultra quality* Agarose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in 1x TAE-Puffer gelöst. 0,1 % *SYBR® Safe DNA Gel Stain*

(Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) diente zur Visualisierung der DNA-Banden. 1 x TAE diente als Laufpuffer. Pro Geltasche wurde ein Mix aus 1 µl 6x DNA-Ladepuffer (New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) und 5 µl DNA-Probe aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurde 1 kb DNA-Größenstandard (New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V und variabler Stromstärke (E844, CONSORT Group, Ottawa, Kanada) für 40 min.

2.2.12 Sequenzierung und *sequence alignments*

Amplifizierte PCR-Produkte wurden mittels eines Kapillarsequenziergerätes (3130x/Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) sequenziert. Zur Analyse der Sequenzierdaten wurde die Software *Clone manager 9.0* (Sci-Ed Software, Denver, USA) genutzt.

Um zu untersuchen, welcher Subgruppe von Isotypen die PspC-Moleküle der beiden klinischen Isolate angehören, wurden zunächst deren Proteinsequenzen aus den erlangten Gensequenzen abgeleitet. Anschließend wurden die Aminosäuresequenzen in Zusammenarbeit mit Franziska Hörhold nach Übereinstimmungen mit bekannten PspC-Isotypen in der Proteindatenbank NCBI BLASTP 2.5.0+ (Stand 22.08.2016) abgeglichen.

2.2.13 Rekombinante Expression von PspC der klinischen Isolate

Um die PspC-Proteine der beiden klinischen Pneumokokkenisolate zu charakterisieren, wurden diese rekombinant in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt. Der Prozess der Klonierung wurde bereits detailliert beschrieben [293].

2.2.13.1 PspC-Expression

Um PspC der klinischen Pneumokokkenisolate zu exprimieren, wurden 3 ml von 50 µg/ml kanamycinhaltigem LB-Medium mit PspC-exprimierenden *E. coli* BL-21 StarTM inokuliert und für 9 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Mit dieser Kultur wurden 30 ml kanamycinhaltiges LB-Medium angeimpft und ü. N. bei 37°C und 180 rpm inkubiert. 2,2 ml der ü. N. Kultur wurden zu 250 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum gegeben. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 180 rpm. In der Log-Phase der Kultur wurde die rekombinante PspC-Expression durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach Inkubation für 4 h bei 37°C und 180 rpm wurden die Bakterien pelletiert.

2.2.13.2 Aufreinigung des rekombinant-exprimierten PspC

Um rekombinantes, His₆-Tag-markiertes PspC aus Einschlusskörpern aufzureinigen, wurde das Bakterienpellet der Expressionskultur in 62 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Ultraschallbehandlung für 20 min auf Eis wurden 313 µl 2 M Magnesiumsulfat (MgSO₄) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben. Es folgten 10 min Inkubation bei RT. Anschließend wurden 0,2 mg/ml Lysozym hinzugegeben und die Proben inkubierten für 30 min im Wasserbad bei 37°C (W20, MLW, Leipzig, Deutschland). Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13000 rcf und 4°C. Das Pellet wurde in ml Ultraschallpuffer resuspendiert und für 20 min auf Eis mit Ultraschall behandelt. Danach wurde die Einschlusskörpersuspension unter kontinuierlichem Rühren (RCT basic, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) in 35 ml Dispersionspuffer überführt. Die Lösung inkubierte ü. N. bei 4°C. Am nächsten Tag wurden 3 ml *ProBond™ Nickel-Chelating Resin* (Life Technologies GmbH, Ober-Olm, Deutschland) in eine Chromatographiesäule (*Econo-Pac® Chromatography Column*, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) überführt und mit 25 ml ddH₂O sowie 25 ml Bindungspuffer gewaschen. Anschließend wurde die Einschlusskörpersuspension zum *ProBond™ Nickel-Chelating Resin* hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation von 20 min bei RT und 50 rpm. Danach wurde das Säulenbett mit 25 ml Waschpuffer gespült. Durch Zugabe von 25 ml Elutionspuffer wurden die an die Matrix gebundenen, His₆-Tag-markierten Proteine eluiert. Das Eluat wurde anschließend mittels Zentrifugation in Zentrifugenfiltern (Amicon® Ultra-15, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) auf ein Endvolumen von 10 ml konzentriert.

2.2.13.3 Rückfaltung des rekombinant-exprimierten PspC

Das konzentrierte Proteineluat wurde 1:10 in Bindungspuffer verdünnt und mittels *ÄKTApurifier 10* (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) auf eine Chromatographiesäule (*HisTrap™ HP column*, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany) geladen. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml ÄKTA-Waschpuffer gespült. Mittels eines linearen Gradienten wurde der ÄKTA-Waschpuffer über einen Zeitraum von 1 h durch ÄKTA-Rückfaltungspuffer ersetzt. Nach zusätzlichem Spülen wurde dieser mittels eines linearen Gradienten über einen Zeitraum von 40 min durch ÄKTA-Elutionspuffer ersetzt. Das Eluat wurde in Fraktionen aufgefangen. PspC-reiche Fraktionen wurden vereinigt und anschließend durch Zentrifugation in Zentrifugenfiltern bei 5200 rcf und 4°C zu einem Gesamtvolumen von 1 ml konzentriert. Das Konzentrat wurde mehrmals in DPBS verdünnt und erneut konzentriert, um einen Austausch des Elutionspuffers gegen DPBS zu gewährleisten. Aufreinigung und Rückfaltung des rekombinanten PspC wurde in Anlehnung eines Protokolls von Reza *et al.* durchgeführt [294].

2.2.13.4 Bestimmung der PspC-Proteinkonzentration

Die Konzentration der rekombinant exprimierten PspC-Moleküle wurde mittels *BCATM protein assay* (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) bestimmt. Dazu wurde nach dem Protokoll für den Mikrotiterplattenmaßstab gearbeitet.

2.2.14 Bio-Layer-Interferometrie

Zur Affinitätsbestimmung der Bindung von Faktor H an PspC6, PspC3 oder das PspC2.1-Fragment SH2 [216] wurde Bio-Layer-Interferometrie mittels BLItzTM (Pall ForteBio Europe, Portsmouth, Vereinigtes Königreich) durchgeführt. Ni-NTA-Biosensoren wurden bei RT 30 s mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden sie 120 s mit rekombinantem PspC oder BSA beladen. Die Ni-NTA-Biosensoren wurden 30 s mit DPBS gewaschen. Dann wurde gereinigter Faktor H als Analyt in den Konzentrationen 1, 62,5, 125, 250, 500 oder 1000 nM hinzugegeben und die Komplexbildung wurde für 240 s verfolgt. Anschließend wurden die Ni-NTA-Biosensoren mit DPBS gewaschen. Die Dissoziation der Proteinkomplexe wurde über einen Zeitraum von 240 s evaluiert. Die Bindungssignale wurden gegen eine DPBS Kontrolle normalisiert. Dazu wurde lediglich DPBS als Analyt verwendet. Die Dissoziationskonstanten (K_D) wurden mittels BLItz ProTM 1.2 Software (Pall ForteBio Europe, Portsmouth, Vereinigtes Königreich) bestimmt.

Um die Affinität der Plasminogen-PspC-Bindung zu bestimmen, wurde das bereits beschriebene Protokoll durchgeführt. Allerdings wurde gereinigtes Plasminogen als Analyt in den Konzentrationen 50, 500, 1000, 2500 und 5000 nM eingesetzt.

2.2.15 Bestimmung der Cofaktoraktivität von Faktor H

Um zu untersuchen, ob PspC-gebundenes Faktor H als Cofaktor für die Serumprotease Faktor I zur Degradation von C3b beiträgt, wurden Cofaktorassays durchgeführt.

Dazu wurden die rekombinanten PspC-Proteine der klinischen Isolate sowie SH2 in 100 µl Immobilisationspuffer mit einer Konzentration von 60 nM auf die Oberfläche von Mikrotiterplatten aufgebracht. Als Negativkontrolle wurden 10 µg/ml BSA genutzt, während 20 µg/ml Faktor H (Complement Technology Inc., Tyler, USA) als Positivkontrolle eingesetzt wurden. Die Immobilisation erfolgte ü. N. bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die proteinhaltigen Vertiefungen mit ELISA-Waschpuffer gespült. Freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation von 200 µl Blockpuffer pro Vertiefung für 1 h bei RT abgesättigt. Danach wurden die Vertiefungen gewaschen und 20 µg/ml Faktor H, gelöst in DPBS, hinzugegeben. In entsprechende Kontrollvertiefungen, welche zur Überprüfung der basalen Aktivität von Faktor I ohne Cofaktoraktivität von Faktor H dienten, wurde lediglich DPBS pipettiert. Auf

eine Inkubation von 1 h bei RT folgten erneut Waschschritte. Anschließend wurden 7,1 µg/ml Faktor I (Complement Technology Inc., Tyler, USA) und 10 µg/ml C3b (Complement Technology Inc., Tyler, USA), gelöst in DPBS, in die entsprechenden Vertiefungen eingebracht. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C wurden die Überstände aus den Vertiefungen in separate Reaktionsgefäße überführt, mit *Roti®-Load 1* Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 98°C inkubiert und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch separiert. Die entstandenen Proteinbanden wurden, wie bereits in Kapitel 2.2.7 beschrieben, mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran überführt und durch in Ziegen generiertes C3-Antiserum und HRP-konjugierte α-Ziegen-IgG pAK detektiert.

Um die Funktionalität von Pneumokokken-gebundenem Faktor H zu testen, wurden Cofaktorassays mit intakten Pneumokokken durchgeführt. Pro Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden $2 \cdot 10^8$ gewaschene Pneumokokken über 1 h bei 37°C immobilisiert. Das nachfolgende Protokoll entspricht dem bereits beschriebenen Cofaktorassay mit PspC-gebundenem Faktor H. Allerdings erfolgte die Cofaktorreaktion über 4 h bei 37°C. Zur Quantifizierung der Chemilumineszenzintensität der Western Blot-Banden wurde die Software Bio-1D Version 15.06a (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland) genutzt.

2.2.16 Opsonisierung von Pneumokokken

S. pneumoniae wurde mit komplementaktivem NHS versetzt, um zu testen, ob Pneumokokken-gebundener Faktor H die Opsonisierung der Bakterienoberfläche inhibiert.

Je $2 \cdot 10^8$ gewaschene Bakterien wurden in separate Reaktionsgefäße überführt und mit 100 µl 10 %igem NHS versetzt. Nach 10 min Inkubation bei 37°C und 400 rpm, wurden die Pneumokokken pelletiert und mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C und 400 rpm in 1:1000 in DPBS verdünntem Maus α-C3d mAk resuspendiert. Nach Waschen der Proben mit DPBS wurde das Bakterienpellet in 1:400 in DPBS verdünntem, Alexa Fluor® 647-konjugiertem Esel α-Maus-IgG pAK resuspendiert. *CellTrace™ Calcein Violet* wurde in einer Verdünnung von 1:500 hinzugegeben, um lebende Bakterien zu markieren. Nach 30 min Inkubation bei RT und 400 rpm in Dunkelheit wurden die Proben gewaschen und in 500 µl DPBS resuspendiert. Die Fluoreszenzsignale von 10000 lebenden Bakterien wurden mittels Durchflussszytometer quantifiziert.

2.2.17 Phagozytose von Pneumokokken durch humane neutrophile Granulozyten

Um zu prüfen, ob sich die durch Faktor H-Rekrutierung beeinflusste Opsonisierung der klinischen *S. pneumoniae* Isolate auf deren Phagozytose durch neutrophile Granulozyten auswirkt, wurden Phagozytoseassays durchgeführt.

2.2.17.1 Isolation von humanen neutrophilen Granulozyten

Die für die Phagozytoseassays benötigten neutrophilen Granulozyten wurden am Tag des Experiments aus Vollblut gesunder Spender in Anlehnung an ein Protokoll von Dasari *et al.* isoliert [295]. Die Arbeit mit neutrophilen Granulozyten wurde stets unter sterilen Bedingungen (HERAsafe™ HSP12, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) durchgeführt.

In einem 15 ml Reaktionsgefäß (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) wurde ein Volumen Dextranlösung mit fünf Volumen Blut gemischt. Die im Blut enthaltenen Erythrozyten sedimentierten für 25 min bei RT. Der Überstand wurde abgenommen und 20 min bei 200 rcf zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml *Hank's balanced salt solution* (HBSS, Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland) resuspendiert. 2 ml Ficoll-paque™ PLUS gradients (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) wurden mit der Zellsuspension überschichtet und anschließend 25 min bei 400 rcf und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in Lysepuffer resuspendiert und für 7 min auf Eis inkubiert um restliche Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurden die neutrophilen Granulozyten für 5 min bei 200 rcf und RT pelletiert, mit 10 ml HBSS gewaschen und final in RPMI 1640 (Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland) aufgenommen. Die Zellzahl der Suspension wurde mittels CASY® Cell Counter and Analyzer (Roche Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland) bestimmt. Die neutrophilen Granulozyten wurden auf $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml in RPMI 1640 (Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland) verdünnt und bis zu ihrer experimentellen Verwendung auf Eis gelagert.

2.2.17.2 Phagozytoseassay

Je $1 \cdot 10^9$ gewaschene Bakterien aus Sp_{HUS}A-, Sp_{HUS}B-, D39- und D39Δ_{pspC}-ü. N.-Kulturen wurden in separate Reaktionsgefäße überführt, in 200 µl Färbelösung aufgenommen und für 10 min bei 37°C und 400 rpm inkubiert. Der Färbelösung wurden gegebenenfalls 10 % NHS zur Opsonisierung oder 10 % iNHS als Kontrolle zugesetzt. Danach wurden die Pneumokokken pelletiert und zwei Mal mit DPBS gewaschen. Nach erneuter Bestimmung der Zellzahl der einzelnen Proben wurden die Pneumokokken auf $5 \cdot 10^8$ Bakterien/ml verdünnt. Anschließend wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µl RPMI 1640 $1 \cdot 10^6$

neutrophile Granulozyten und $1 \cdot 10^6$ Pneumokokken (MOI 1:1) vereinigt. Diese Inkubierten gemeinsam für 2 min und 30 s bei 27°C und 400 rpm. Dabei erfolgte die Phagozytose der Pneumokokken. Die Reaktion wurde mit 200 µl eiskaltem DPBS abgestoppt. Die Fluoreszenzsignale der Proben wurden mittels Durchflusszytometer quantifiziert. Dabei wurde der *BacLight™ Green Bacterial Stain*-MFI der neutrophilen Granulozyten ermittelt. Zur MFI-Berechnung sowie zur Visualisierung der Messergebnisse wurde die Software FlowJo 7.2.5 verwendet.

2.2.18 Kultur von Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene

Die Arbeit mit humanen Endothelzellen wurde stets unter sterilen Bedingungen (HERAsafe™ HSP12, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) durchgeführt.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC; ATCC CRL-1730, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) wurden in DMEM, supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 1 % Ultraglutamin I (Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland) und 50 µg/ml Gentamicinsulfat (Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland), bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Um die adhärennten Zellen aus den 250 ml *CELLSTAR®* Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) zu lösen, wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 1 ml Trypsin (0,25 %)-EDTA (0,02 %)-Lösung (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) gewaschen. Anschließend wurden die HUVEC mit 1 ml Trypsin (0,25 %)-EDTA (0,02 %)-Lösung für 5 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden dann in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl der Suspension wurde mittels *CASY® Cell Counter and Analyzer* bestimmt. In eine 250 ml Kulturflasche wurden $1,5 \cdot 10^6$ Zellen eingesät und bis zur Konfluenz kultiviert.

Für Studien zur Plasmin-vermittelten Schädigung von HUVEC wurden 12000 Zellen in 100 µl Kulturmedium pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte (Nunc Mikrotiterplatte 96 F, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) eingesät und für zwei Tage bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit bis zur Konfluenz kultiviert.

2.2.19 Adhäsion von Pneumokokken an HUVEC

Die Adhäsion an humane Endothelzellen ist von kritischer Bedeutung für die Pathogenität von *S. pneumoniae*. Deshalb wurde geprüft, ob die Rekrutierung von Faktor H an die Oberfläche von Pneumokokken deren Bindung an humane Endothelzellen beeinflusst.

Dazu wurden HUVEC zunächst bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit bis zur Konfluenz in Vertiefungen schwarzer Mikrotiterplatten (*high binding black Fluotrack*

microplate, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) kultiviert. Je $6 \cdot 10^8$ gewaschene Pneumokokken von ü. N.-Kulturen wurden in separate Reaktionsgefäße überführt und mit 100 µg/ml Faktor H, 50 % iNHS oder DPBS allein in einem Gesamtvolumen von 50 µl/Probe versetzt. Nach Inkubation für 1 h bei 37°C und 400 rpm wurden die Pneumokokken mit DPBS gewaschen. Die Bakterien wurden dann in 100 µl Färbelösung aufgenommen und für 30 min bei RT, 400 rpm und Dunkelheit inkubiert. Nach Waschen der Bakterien wurde die OD₆₀₀ der Proben erneut kontrolliert. Anschließend wurden die Pneumokokken in FKS-freiem DMEM aufgenommen und je $2 \cdot 10^7$ Bakterien pro Vertiefung zu den HUVEC gegeben. In Kontrollproben wurden keine Pneumokokken eingebracht. Die Mikrotiterplatte wurde dann für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Nach Inkubation für 1 h bei 37°C, 5 % CO₂, in Dunkelheit, wurden die Vertiefungen mit DPBS gewaschen. Nach Verwerfen der Waschlösung wurden 100 µl DPBS pro Vertiefung hinzugegeben und anschließend die Fluoreszenzsignale mittels Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt.

2.2.20 Plasminogen-Aktivierungsassay

Um zu untersuchen, ob PspC- und Pneumokokken-gebundenes Plasminogen mittels Plasminogenaktivatoren zur Protease Plasmin konvertiert werden kann und generiertes Plasmin proteolytisch aktiv ist, wurden Plasminogen-Aktivierungsassays durchgeführt.

2.2.20.1 Plasmin-vermittelte Spaltung von S-2251

Die rekombinanten PspC-Proteine der klinischen Isolate, SH2 sowie Tuf wurden mit einer Konzentration von 60 nM in 100 µl Immobilisationspuffer auf die Oberfläche von Mikrotiterplatten aufgebracht. Als Negativkontrolle wurden 10 µg/ml Gelatine (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt, während 10 µg/ml Plasminogen als Positivkontrolle genutzt wurden. Die Immobilisierung erfolgte ü. N. bei 4°C. Anschließend wurden die proteinhaltigen Vertiefungen mit ELISA-Waschpuffer gespült. Freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation von 200 µl ELISA-Blockpuffer pro Vertiefung für 1 h bei RT abgesättigt. Danach wurden die Vertiefungen erneut gewaschen und 10 µg/ml, in DPBS gelöstes Plasminogen hinzugegeben. Zur Prüfung der Plasmin-unabhängigen Spaltung des Substrates wurde in entsprechende Kontrollvertiefungen lediglich DPBS pipettiert. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT folgten Waschschrte. Anschließend wurden 0,4 µg/ml Urokinase (uPA; Technoclone GmbH, Wien, Österreich) und 300 µg/ml S-2251 (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Deutschland), gelöst in Reaktionspuffer, in die Vertiefungen eingebracht. Um die proteolytische Aktivität von nicht aktiviertem Plasminogen zu

überprüfen, wurde in Kontrollvertiefungen ausschließlich in Reaktionspuffer gelöstes S-2251 hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation über 24 h bei 37°C. Die Spaltung des chromogenen Substrats S-2251 wurde durch die stündliche Messung der Absorption bei 405 nm Wellenlänge quantifiziert (SpectraMax® 190, Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riss, Deutschland).

Um zu prüfen, ob Pneumokokken-gebundenes Plasminogen zu Plasmin konvertierbar ist und aktiviertes Plasmin S-2251 spaltet, wurden je $2 \cdot 10^8$ gewaschene Pneumokokken aus ü. N.-Kulturen pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte eingebracht. Die Immobilisation erfolgte für 1 h bei 37°C. Nachfolgende experimentelle Abläufe wurden, wie bereits beschrieben, durchgeführt.

2.2.20.2 Plasmin-vermittelte Spaltung von Fibrinogen

PspC6 und PspC3 wurden mit einer Molarität von 60 nM, in 100 µl DPBS, ü. N., bei 4°C auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Als Negativkontrolle wurden 10 µg/ml BSA genutzt, während 20 µg/ml Plasminogen als Positivkontrolle eingesetzt wurden. Nach Immobilisation wurden die proteinhaltigen Vertiefungen mit ELISA-Waschpuffer gespült. Freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation von 200 µl ELISA-Blockpuffer pro Vertiefung für 1 h bei RT abgesättigt. Danach wurden die Vertiefungen erneut gewaschen und 20 µg/ml, in DPBS gelöstes Plasminogen hinzugegeben. Zur Prüfung der Plasmin-unabhängigen Spaltung von Fibrinogen, wurde in Kontrollvertiefungen ausschließlich DPBS pipettiert. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT erfolgten Waschschrte. Anschließend wurden 1 µg/ml uPA und 10 µg/ml Fibrinogen (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), gelöst in DPBS, in die Vertiefungen eingebracht. Um basale Proteolyse des Fibrinogens zu evaluieren, wurde in Kontrollvertiefungen ausschließlich in DPBS gelöstes Fibrinogen hinzugegeben. Nach Inkubation für verschiedene Zeitspannen (1, 2, 4, 6, 18 und 24 h) bei 37°C, wurden die Überstände aus den Vertiefungen in separate Reaktionsgefäße überführt, denaturiert und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch separiert. Die gebildeten Proteinbanden wurden, wie bereits in Kapitel 2.2.7 beschrieben, mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran überführt und durch in Ziegen generiertes Fibrinogen Antiserum und HRP-konjugierte α -Ziegen-IgG pAK detektiert.

Um zu prüfen, ob Pneumokokken-gebundenes und aktiviertes Plasmin das natürliche Substrat Fibrinogen spaltet, wurden je $2 \cdot 10^8$ gewaschene Pneumokokken aus ü. N.-Kulturen pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte eingebracht. Die Immobilisation erfolgte für 1 h bei 37°C. Nachfolgende experimentelle Abläufe wurden, wie bereits beschrieben, durchgeführt.

2.2.20.3 Plasmin vermittelte Spaltung von C3b

PspC6 und PspC3 wurden in 100 µl Immobilisationspuffer mit einer Molarität von 60 nM, ü. N. und bei 4°C auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Als Negativkontrolle wurden 10 µg/ml BSA eingesetzt, während 20 µg/ml Plasminogen als Positivkontrolle genutzt wurden. Anschließend wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit ELISA-Waschpuffer gespült. Freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation von µl ELISA-Blockpuffer pro Vertiefung für 1 h bei RT abgesättigt. Anschließend wurden die Vertiefungen gewaschen und 20 µg/ml, in DPBS gelöstes Plasminogen hinzugegeben. Zur Prüfung der Plasmin-unabhängigen Spaltung von C3b, wurde in Kontrollvertiefungen ausschließlich DPBS pipettiert. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT erfolgten Waschschrte. Anschließend wurden 1 µg/ml uPA und 10 µg/ml C3b, gelöst in DPBS, in die Vertiefungen eingebracht. Um die basale Proteolyse von C3b zu testen, wurde in Kontrollvertiefungen ausschließlich in DPBS gelöstes C3b hinzugegeben. Nach Inkubation für verschiedene Zeitspannen (1, 2, 4 und 24 h) bei 37°C wurden die Überstände aus den Vertiefungen in separate Reaktionsgefäße überführt, denaturiert und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die entstandenen Proteinbanden wurden, wie bereits in Kapitel 2.2.7 beschrieben, mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran überführt und durch in Ziegen generiertes C3-Antiserum und HRP-konjugierte α-Ziegen-IgG pAK detektiert.

Um zu prüfen, ob Pneumokokken-gebundenes und aktiviertes Plasmin das natürliche Substrat C3b spaltet, wurden je $2 \cdot 10^8$ gewaschene Pneumokokken aus ü. N.-Kulturen pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte eingebracht. Die Immobilisation erfolgte für 1 h bei 37°C. Nachfolgende experimentelle Abläufe wurden, wie bereits beschrieben, durchgeführt.

2.2.21 Einfluss von Plasmin auf die Vitalität von HUVEC

Das Proenzym Plasminogen wurde in Gegenwart von vitalen HUVEC zur Protease Plasmin aktiviert, um zu prüfen, ob Plasmin humane, vaskuläre Endothelzellen schädigt.

Dazu wurden HUVEC zunächst bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit bis zur Konfluenz in Mikrotiterplattenvertiefungen kultiviert. Alle Vertiefungen wurden mit 100 µl Kulturmedium gespült. Anschließend wurden 200 µg/ml Plasminogen und 80 µg/ml gewebespezifischer Plasminogenaktivator (tPA; Technoclone GmbH, Wien, Österreich) in Kulturmedium zu einem Gesamtvolumen von 50 µl pro Vertiefung hinzugegeben. Zur Inhibition der Plasmin-Proteaseaktivität wurde 100 µg/ml Aprotinin eingesetzt. Als Negativkontrollen fungierten Proben, denen ausschließlich Plasminogen, tPA, Aprotinin oder BSA zugesetzt wurden. Als Positivkontrolle wurde $1 \cdot 10^{-3}$ % Triton X-100 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt, welches Nekrose der HUVEC induziert. Um Referenzwerte der Vitalität zu erhalten, wurden unbehandelte Kontrollen genutzt, denen

ausschließlich Kulturmedium zugesetzt wurde. Die Zellen inkubierten für 24 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit. Zur Evaluierung morphologischer Veränderungen der HUVEC wurden anschließend mikroskopische Aufnahmen der Zellen mittels *IN Cell Analyzer 2000* (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany) durchgeführt. Nach Waschen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit DPBS wurden jeder Vertiefung 100 µl CellTiter-blue® (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) zugesetzt. Nach einer Inkubation von 2 h und 30 min bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit wurde der Umsatz von Resazurin zu Resorufin photometrisch quantifiziert. Dazu wurde die Absorption mittels Tecan Sunrise™ (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei 570 nm und der Referenzwellenlänge von 600 nm bestimmt. Die Berechnungen der HUVEC-Vitalität wurden mit der Magellan™ Software (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) durchgeführt.

2.2.22 Einfluss von Pneumokokken-gebundenem Plasmin auf die Vitalität von HUVEC

Plasminogen wurde an die Oberfläche von Pneumokokken gebunden und zur Protease Plasmin aktiviert. Anschließend wurden die Plasmin-beschichteten Pneumokokken mit humanen Endothelzellen inkubiert, um zu prüfen, ob diese durch *S. pneumoniae*-gebundenes Plasmin geschädigt werden.

2.2.22.1 Zytotoxizitätsassay zum Einfluss von Pneumokokken-gebundenem Plasmin auf die Vitalität von HUVEC

HUVEC wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit bis zur Konfluenz in Mikrotiterplattenvertiefungen kultiviert.

Je $1 \cdot 10^8$ gewaschene Pneumokokken aus ü.N.-Kulturen wurden in separate Reaktionsgefäße überführt, in DPBS mit 200 µg/ml Plasminogen oder DPBS allein aufgenommen und für 1 h bei 37°C und 400 rpm inkubiert. Danach wurden die Pneumokokken in HUVEC-Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden $3 \cdot 10^6$ Pneumokokken in einem Gesamtvolumen von 50 µl Kulturmedium aufgenommen und entsprechend der Probe 80 µg/ml tPA und 100 µg/ml Aprotinin zugesetzt. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C und 400 rpm wurden die Ansätze zu den gewaschenen, konfluenten HUVEC gegeben. Es folgte eine Inkubation von 24 h bei 37°C, 5 % CO₂. Anschließend wurden die Vertiefungen mit DPBS gewaschen. Dann wurden jeder Vertiefung 100 µl CellTiter-blue® zugesetzt. Die Entwicklung erfolgte wie bereits in Kapitel 2.2.21 beschrieben.

2.2.22.2 Fluoreszenzmikroskopie zum Einfluss von Pneumokokken-gebundenem Plasmin auf die Vitalität von HUVEC

HUVEC wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit bis zur Konfluenz in Vertiefungen von 12 well μ -Chamber Objektträgern (Ibidi GmbH, Planegg, Deutschland) kultiviert.

Je $1 \cdot 10^9$ gewaschene Pneumokokken aus ü. N.-Kulturen wurden in separate Reaktionsgefäße überführt, in 200 μ l Färbelösung I aufgenommen und für 30 min bei 37°C, 400 rpm und in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Bakterien mit DPBS gewaschen und dann in DPBS mit 200 μ g/ml Plasminogen oder DPBS allein aufgenommen. Nach 1 h Inkubation bei 37°C, 400 rpm und in Dunkelheit wurden die Bakterien in FKS-freiem DMEM gewaschen. Anschließend wurden $5 \cdot 10^7$ Pneumokokken in einem Gesamtvolumen von 50 μ l FKS-freiem DMEM aufgenommen und entsprechend der Probe 80 μ g/ml tPA und 100 μ g/ml Aprotinin zugesetzt. Nach Inkubation für 1 h bei 37°C, 400 rpm und in Dunkelheit wurden die Ansätze zu den konfluenten HUVEC gegeben. Es folgte eine Inkubation von 1 h bei 37°C, 5 % CO₂ und in Dunkelheit. Danach wurden die Vertiefungen mit je 200 μ l DMEM gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation mit 100 μ l pro Vertiefung in DPBS gelöstem, 4 %igem Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Deutschland) für 5 min, bei 37°C, 5 % CO₂ und in Dunkelheit fixiert. Nach erneutem Waschen wurden 100 μ l Färbelösung II zu jeder Vertiefung gegeben. Diese inkubierte für 30 min bei 37°C, 5 CO₂ und in Dunkelheit. Anschließend wurden die Vertiefungen mit je 200 μ l DPBS gewaschen, die Silikondichtungen entfernt und die Objektträger getrocknet. Danach wurden Deckgläschen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) mittels ProTaq[®] Mount Fluor (BIOCYC GmbH & Co.KG, Luckenwalde, Deutschland) auf den Objektträgern fixiert. Die Proben wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM 710, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) und der Software ZEN 2011 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet.

2.2.22.3 Quantifizierung der Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen zur Exposition subendothelialer Matrix

Um statistisch relevante Aussagen über die Exposition subendothelialer Matrix durch Plasmin-beschichtete Pneumokokken treffen zu können, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Marc T. Figge und Dr. Zoltán Cseresnyés zehn Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen jeder Kondition mittels eines selbst geschriebenen Makrobefehls in ImageJ (Fiji, Version 1.15f; GitHub Inc., San Francisco, USA) analysiert.

Zunächst wurde ein Schwellenwert von 5-7 % für den *Texas Red*-Kanal der Aufnahmen bestimmt. Das entstandene Bild wurde in eine binäre Abbildung konvertiert,

mittels *gaussian kernel* einer Breite von 11 Pixeln (px) verwischt, invertiert und anschließend in eine binäre Maske umgewandelt. Alle Löcher in der Maske wurden gefüllt. Danach wurde die Maske um 10 px erodiert. Um falsch positive Löcher in der Maske auszuschließen, wurden die Abbildungen des DAPI-Kanals als Werkzeug zur Verfeinerung der Analyse genutzt. Die DAPI-Abbildung wurde ebenfalls mittels *gaussian kernel* einer Breite von 11 px verwischt. Außerdem wurde durch den Otsu-Algorithmus ein Schwellenwert bestimmt. Die daraus resultierende Maske wurde um 10 px erodiert und invertiert. Durch Überlagern der korrespondierenden DAPI- und *Texas Red*-Masken wurden Löcher eliminiert, in denen sich ein DAPI-Signal, also ein Zellkern befindet. Somit konnten falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Die korrigierte Maske wurde dann mit einem *particle finder*-Algorithmus analysiert, um Löcher zwischen den Zellen zu detektieren. Die minimale Größe der Löcher wurde basierend auf der durchschnittlichen Zellgröße limitiert, während deren maximale Größe durch die absolute Bildfläche begrenzt war.

2.2.23 Statistische Analysen

Zur statistischen Auswertung durchgeführter Experimente wurde die Software GraphPad Prism® (Version 5.03) genutzt. Insofern nicht explizit anders erwähnt, wurde zur Prüfung der Signifikanz der ungepaarte t-Test durchgeführt. Signifikanzniveaus werden als nicht signifikant (ns), $p \geq 0,05$ oder signifikant *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$ indiziert.

3 Ergebnisse

3.1 Die klinischen *S. pneumoniae*-Isolate binden den humanen Komplementregulator Faktor H an ihre Oberfläche

Faktor H ist der zentrale Regulator der Komplementkaskade auf Ebene der C3-Konvertase und von großer Bedeutung für die zeitliche sowie räumliche Begrenzung der Komplementaktivität [14]. In dieser Promotion wurde untersucht, ob die klinischen *S. pneumoniae*-Stämme Faktor H binden und damit dessen regulatorische Aktivität zur Komplementevasion missbrauchen können.

Die Bindung von gereinigtem Faktor H an Pneumokokken wurde zunächst durch *Whole cell*-ELISA evaluiert. Die beiden klinischen Isolate Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B rekrutieren signifikant mehr gereinigten Faktor H an ihre Oberfläche als der virulente D39-Referenzstamm (Abb. 8A). Effizientere Bindung von Faktor H durch die klinischen Isolate (Sp_{HUS}A, ΔMFI: 14557 und Sp_{HUS}B ΔMFI: 13783) im Vergleich zu D39 (ΔMFI: 276) wurde mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen bestätigt (Abb. 8B). ΔMFI beschreibt dabei die Differenz der mittleren Fluoreszenzintensität der Proben zur Faktor H-Bindung der einzelnen Stämme und der entsprechenden Antikörperkontrollen. Die *PspC-knock out*-Mutante von D39 (D39Δ*pspC*) bindet kein gereinigten Faktor H an seine Oberfläche, was sowohl durch *Whole cell*-ELISA als auch mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen (ΔMFI: 7) detektiert wurde.

Um sich physiologischen Bedingungen anzunähern, wurde iNHS als Faktor H-Quelle für die nachfolgenden Versuche eingesetzt. Die Bindung von Faktor H aus iNHS an Pneumokokken wurde durch *Whole cell*-ELISA untersucht. Die klinischen Stämme Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B rekrutieren signifikant mehr Faktor H an ihre Oberfläche als der D39-Referenzstamm (Abbildung 8C). Auch mit iNHS als Quelle wurde die effizientere Bindung von Faktor H durch die klinischen Isolate (Sp_{HUS}A, ΔMFI: 17585 und Sp_{HUS}B ΔMFI: 17924) im Vergleich zu D39 (ΔMFI: 238) mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen bestätigt (Abb. 8D). In *Whole cell*-ELISA wurde eine schwache Faktor H-Rekrutierung durch D39Δ*pspC* detektiert, welche nicht mittels Durchflusszytometrie bestätigt werden konnte (ΔMFI: -5).

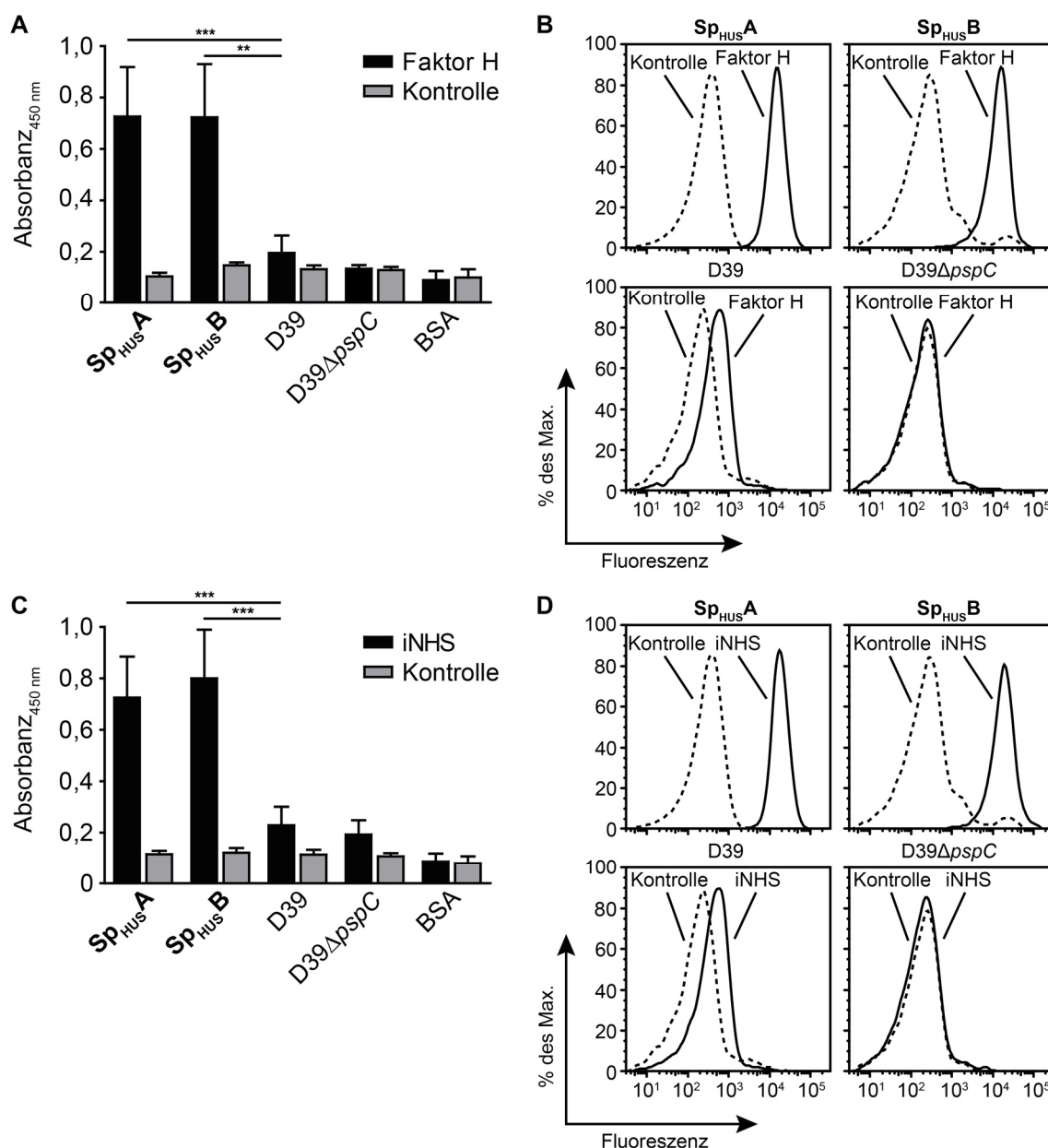


Abbildung 8: Die *S. pneumoniae*-Isolate der HUS-Patienten binden Faktor H

(A) Whole cell-ELISA zur Detektion der Faktor H-Bindung an die Pneumokokkenoberfläche. Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B, der Referenzstamm D39, dessen isogene PspC-knock out-Mutante D39ΔpspC sowie BSA (5 µg/ml) wurden auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Die Bindung von Faktor H (10 µg/ml) wurde mittels mAK T13 (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α-Maus-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) detektiert. Proben, denen kein Faktor H als Ligand zugesetzt wurde, werden als Kontrollen bezeichnet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (MW) + Standardabweichung (SD) aus vier unabhängigen Experimenten. Die Absorbanz der Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B ist signifikant höher als die des D39-Referenzstammes. **(B)** Durchflusszytometrische Untersuchung zur Detektion der Faktor H-Bindung an Pneumokokken. Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B, D39 und D39ΔpspC wurden mit Faktor H (50 µg/ml) inkubiert. Die Faktor H-Bindung wurde mittels mAK T13 (Verdünnung 1:100) und Alexa Fluor® 647-konjugiertem α-Maus-IgG pAK (Verdünnung 1:400) detektiert. Proben, denen kein Faktor H als Ligand zugesetzt wurde, werden als Kontrollen bezeichnet. Ein repräsentatives aus vier unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die MFI der Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B sind höher als die der D39-Referenz. **(C)** Whole cell-ELISA zur Detektion der Faktor H-Bindung aus iNHS an Pneumokokken. Der experimentelle Ablauf gleicht dem aus Panel (A). Als Ligand wurde iNHS (25 %) eingesetzt. Die Daten repräsentieren MW + SD aus vier unabhängigen Experimenten. Die Absorbanz der Proben der klinischen Isolate ist signifikant höher als die der D39-Referenz.

(D) Durchflusszytometrische Untersuchung zur Detektion der Faktor H-Bindung aus iNHS an Pneumokokken. Der experimentelle Ablauf gleicht dem aus Panel (B). Die Pneumokokken wurden mit iNHS (50 %) inkubiert. Ein repräsentatives aus vier separaten und unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die MFI der Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B ist höher als die des D39-Referenzstammes.

3.2 Die klinischen Pneumokokkenstämme exprimieren den Virulenzfaktor Tuf auf ihrer Oberfläche

S. pneumoniae besitzt zwei Faktor H-bindende Virulenzfaktoren, Tuf und PspC [113, 222]. In dieser Promotion wurde untersucht, ob die klinischen *S. pneumoniae*-Stämme das *moonlighting* Protein Tuf auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Die Tuf-Expression der klinischen Isolate wurde zunächst durch *Whole cell*-ELISA evaluiert. Sp_{HUS}A exprimiert signifikant mehr Tuf auf der Oberfläche als der D39-Referenzstamm. Zwischen Sp_{HUS}B und D39 sind keine Unterschiede detektierbar (Abb. 9A). Die erhöhte Tuf-Oberflächenexposition von Sp_{HUS}A (Δ MFI: 3297) im Vergleich zu Sp_{HUS}B (Δ MFI: 2280) und D39 (Δ MFI: 2042) wurde mittels Durchflusszytometrie bestätigt (Abb. 9B). Tuf ist durch *Whole cell*-ELISA und Durchflusszytometrie (Δ MFI: 2200) auf der Oberfläche von D39 Δ pspC nachweisbar. Zudem wurde Tuf in der Membranproteinfraktion (MP) der klinischen Isolate (Spuren 1 und 2) sowie der Referenzstämme (Spuren 3 und 4) mittels Western Blot als 55 kDa-Protein detektiert. Die Mobilität der Proteinbande ist mit der des rekombinant-exprimierten Tuf (Spur 6) vergleichbar (Abb. 9C). Die *tuf*-Gene von Sp_{HUS}A (Spur 1), Sp_{HUS}B (Spur 2) und D39 (Spur 3) wurden mittels PCR aus deren genomischer DNA amplifiziert und durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die *tuf*-Gene der drei Stämme haben eine Länge von 1,2 kbp (Abb. 9D).

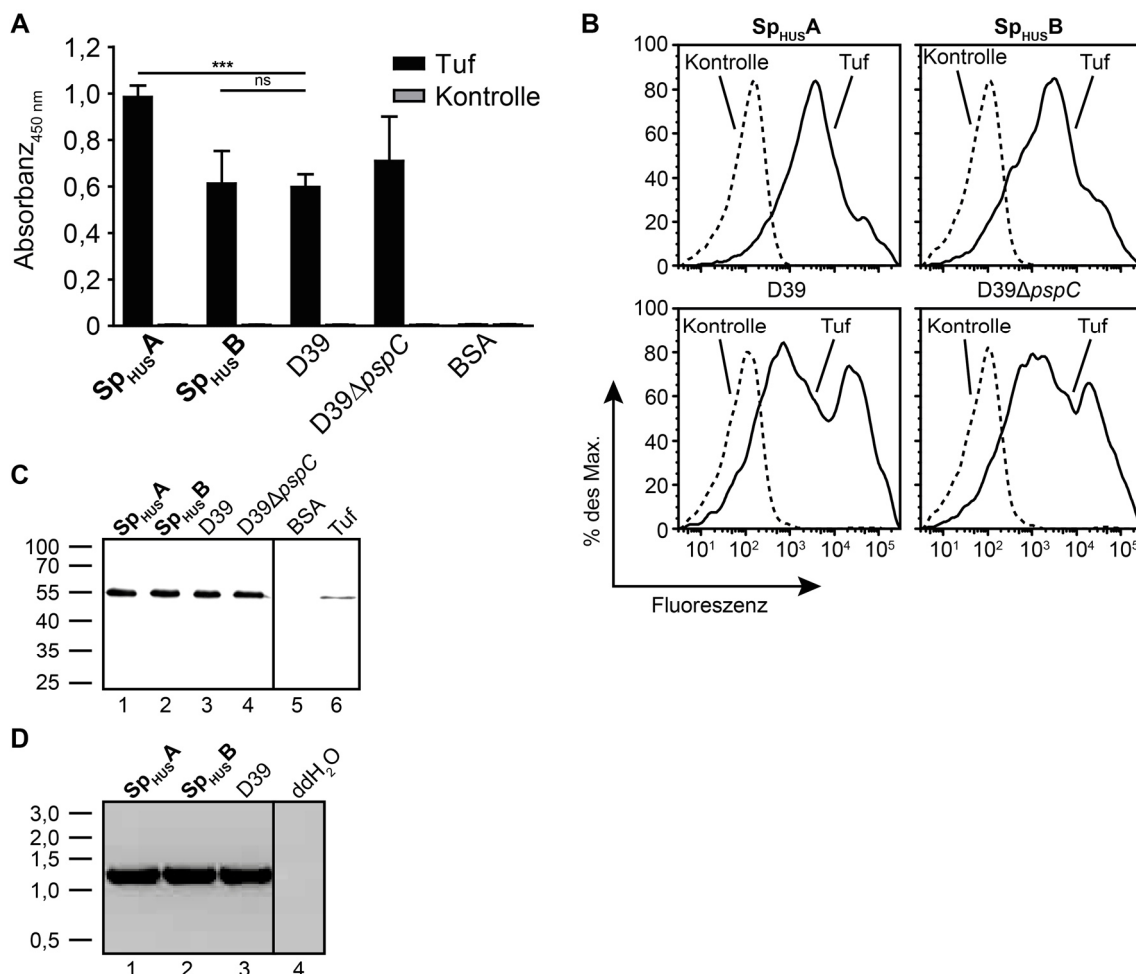


Abbildung 9: Die klinischen *S. pneumoniae*-Isolate exprimieren Tuf auf ihrer Oberfläche

(A) Whole cell-ELISA zur Quantifizierung der Tuf-Expression von Pneumokokken. Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B, D39, D39ΔpspC sowie BSA (5 µg/ml) wurden auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Die Expression von Tuf wurde mittels Tuf-Antiserum (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α-Kaninchen-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) detektiert. Proben, denen kein Tuf-Antiserum zugesetzt wurde, werden als Kontrollen bezeichnet. Die Daten repräsentieren MW + SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die Absorbanz der Probe von Sp_{HUS}A ist signifikant höher als die der D39-Referenz.

(B) Durchflusszytometrische Untersuchung zur Quantifizierung von Tuf auf der Oberfläche von Pneumokokken. Die Tuf-Expression von Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B, D39 und D39ΔpspC wurde mit Tuf-Antiserum (Verdünnung 1:25) und Alexa Fluor® 647-konjugiertem α-Kaninchen-IgG pAK (Verdünnung 1:400) detektiert. Proben, denen kein Tuf-Antiserum zugesetzt wurde, werden als Kontrollen bezeichnet. Ein repräsentatives aus vier unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die MFI der Probe von Sp_{HUS}A ist höher als die von Sp_{HUS}B und D39.

(C) Western Blot zur Bestimmung des Tuf-Molekulargewichts der klinischen Isolate. Die MP von Sp_{HUS}A (Spur 1), Sp_{HUS}B (Spur 2), D39 (Spur 3) und D39ΔpspC (Spur 4) wurden isoliert, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geplottet. Tuf wurde mittels Tuf-Antiserum (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α-Kaninchen-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) detektiert. Der Molekulargewichtsstandard ist in Kilodalton (kDa) angegeben. Die Tuf-Proteinbande läuft bei allen getesteten Stämmen mit 55 kDa auf Höhe der Kontrolle (0,2 µg rekombinantes Tuf, Spur 6). Die BSA-Kontrolle (Spur 5) zeigt keine Proteinbande.

(D) Agarosegel zur Bestimmung der *tuf*-Genlänge der klinischen Isolate. Das *tuf*-Gen wurde mittels PCR aus genomischer DNA von Sp_{HUS}A (Spur 1), Sp_{HUS}B (Spur 2) und D39 (Spur 3) amplifiziert und durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Der Molekulargewichtsstandard ist in Kilobasenpaaren (kbp) angegeben. Die *tuf*-Genbanden der getesteten *S. pneumoniae*-Stämme laufen auf einer Höhe von 1,2 kbp. Die ddH₂O-Kontrolle zeigt keine *tuf*-Bande.

3.3 Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B exprimieren große Mengen PspC auf ihrer Oberfläche

Es wurde zudem geprüft, ob die klinischen *S. pneumoniae*-Isolate den multivalenten Virulenzfaktor PspC auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Die PspC-Expression der klinischen Stämme wurde zunächst mittels *Whole cell*-ELISA analysiert. Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B exprimieren signifikant mehr PspC auf der Oberfläche als die virulente D39-Referenz (Abb. 10A). Die verstärkte Exposition von PspC auf der Oberfläche der klinischen Stämme (Sp_{HUS}A ΔMFI: 6957 und Sp_{HUS}B ΔMFI: 7535) im Vergleich zu D39 (ΔMFI: 1036) wurde mittels Durchflusszytometrie bestätigt (Abb. 10B). PspC wurde durch *Whole cell*-ELISA, aber nicht mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen (ΔMFI: 32) auf der Oberfläche von D39Δ*pspC* detektiert. PspC wurde in der MP der beiden klinischen Isolate sowie von D39 mittels Western Blot detektiert. Das Molekulargewicht des Proteins variiert. Sp_{HUS}A-PspC hat eine Größe von 105 kDa (Spur 1), Sp_{HUS}B-PspC von 82 kDa (Spur 2) und D39-PspC von 98 kDa (Spur 3). In der MP von D39Δ*pspC* wurde keine PspC-Bande detektiert (Spur 4). Das deutlich kürzere PspC2.1-Fragment SH2 wurde mit 36 kDa nachgewiesen (Spur 6) (Abb. 10C) [216]. Die *pspC*-Gene von Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B und D39 wurden mittels PCR aus deren genomischer DNA amplifiziert und durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die *pspC*-Gene der drei Stämme variieren in ihrer Länge. Sp_{HUS}A-*pspC* hat eine Länge von 2,2 kbp (Spur 1), Sp_{HUS}B-*pspC* von 1,9 kbp (Spur 2) und D39-*pspC* von 2,0 kbp (Spur 3) (Abb. 10D).

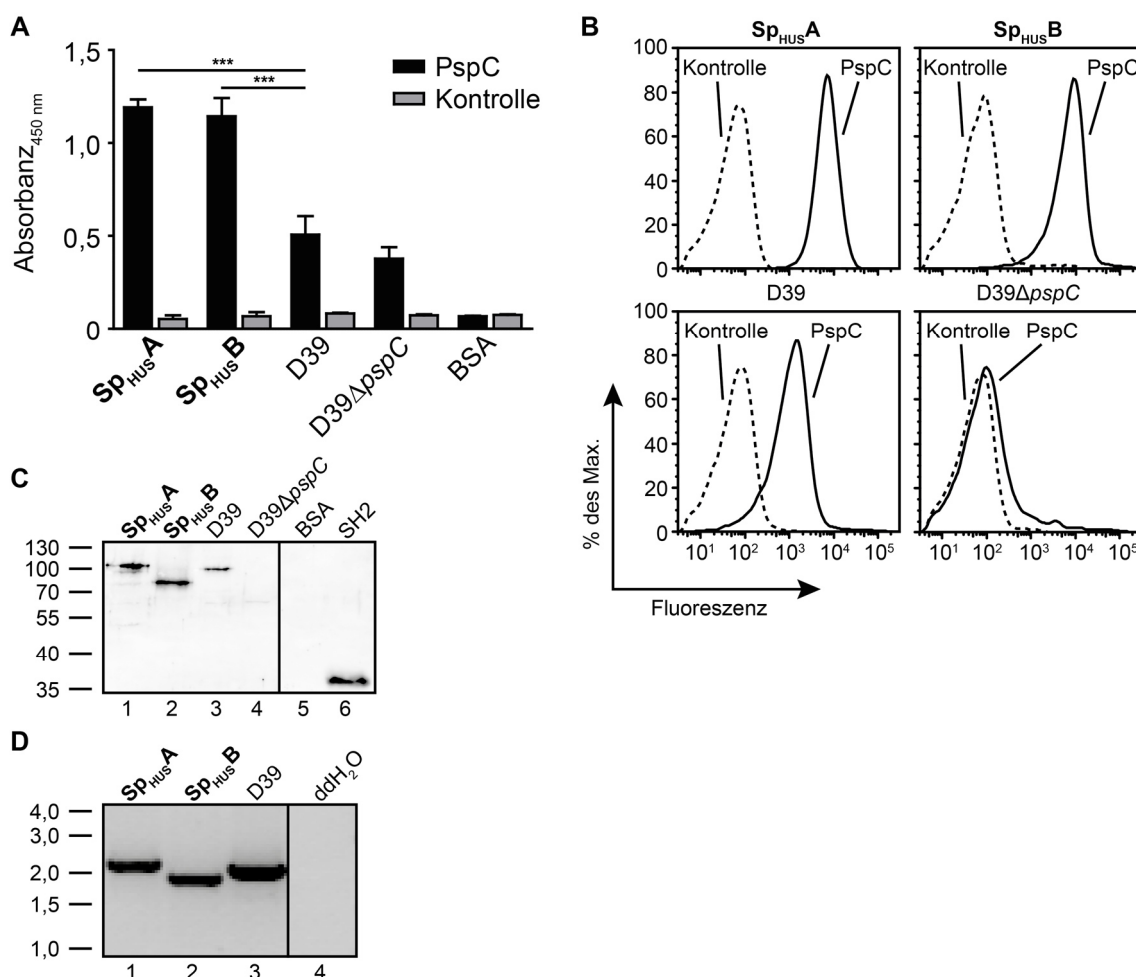


Abbildung 10: Die klinischen *S. pneumoniae*-Isolate exprimieren PspC auf ihrer Oberfläche

(A) Whole cell-ELISA zur Quantifizierung der PspC-Expression von Pneumokokken. Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B, D39, D39Δ_{pspC} sowie BSA (5 µg/ml) wurden auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Die Expression von PspC wurde mittels SH2-Antiserum (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α-Kaninchen-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) detektiert. Proben, denen kein SH2-Antiserum zugesetzt wurde, werden als Kontrollen bezeichnet. Die Daten repräsentieren MW + SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die Absorbanz der Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B sind signifikant höher als die der D39-Referenz. **(B)** Durchflusszytometrische Untersuchung zur Quantifizierung von PspC auf der Oberfläche von *S. pneumoniae*. Die PspC-Expression von Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B, D39 und D39Δ_{pspC} wurde mit SH2-Antiserum (Verdünnung 1:100) und Alexa Fluor® 647-konjugiertem α-Kaninchen-IgG pAK (Verdünnung 1:400) detektiert. Proben, denen kein SH2-Antiserum zugesetzt wurde, werden als Kontrollen bezeichnet. Ein repräsentatives aus sechs unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die MFI der Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B sind höher als die von D39. **(C)** Western Blot zur Bestimmung des PspC-Molekulargewichts der klinischen Isolate. Die MP von Sp_{HUS}A (Spur 1), Sp_{HUS}B (Spur 2), D39 (Spur 3) und D39Δ_{pspC} (Spur 4) wurden isoliert, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geplottet. PspC wurde mittels SH2-Antiserum (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α-Kaninchen-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) detektiert. Der Molekulargewichtsstandard ist in kDa angegeben. PspC von Sp_{HUS}A wurde als 105 kDa-, PspC von Sp_{HUS}B als 82 kDa- und D39-PspC als 98 kDa-Protein detektiert. Die D39Δ_{pspC}-Probe und die BSA-Kontrolle (Spur 5) zeigen keine Proteinbande. **(D)** Agarosegel zur Bestimmung der *pspC*-Genlänge der klinischen Isolate. Das *pspC*-Gen wurde mittels PCR aus genomischer DNA von Sp_{HUS}A (Spur 1), Sp_{HUS}B (Spur 2) und D39 (Spur 3) amplifiziert und durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Der Molekulargewichtsstandard ist in kbp angegeben. Die *pspC*-Genbande von Sp_{HUS}A läuft bei 2,2 kbp, *pspC* von Sp_{HUS}B bei 1,9 kbp und *pspC* von D39 bei 2,0 kbp. Die ddH₂O-Kontrolle zeigt keine *pspC*-Bande.

3.3.1 Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B exprimieren PspC-Isotypen der Subgruppen PspC6 und PspC3

PspC ist als polymorpher Virulenzfaktor bekannt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden bereits elf Subgruppen von Isotypen identifiziert, welche sich in zwei Familien untergliedern lassen [213]. Um strukturelle Besonderheiten der PspC-Moleküle der klinischen *S. pneumoniae*-Isolate zu eruieren, wurde *pspC* von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B sequenziert, in ihre Aminosäuresequenz übersetzt und in Zusammenarbeit mit Franziska Hörhold mittels multibler Sequenzanalysen evaluiert.

PspC beider klinischer Isolate beinhaltet das Faktor H-bindende Motiv -ALNIKLSAIKTK- innerhalb der hypervariablen Region. Allerdings wurde die Deletion einer Alanin-Aminosäure an Position sieben im Vergleich zum Faktor H-bindenden Motiv -ALNIKLSAIKTK- von D39 (NCBI: AAF73779.1) detektiert [225]. Die PspC-Moleküle von Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B und D39 enthalten in jeder ihrer repetitiven Regionen je ein slgA-bindendes Hexapeptid -(Y/R)RNYPT- [210]. Zudem besitzen die drei PspC-Moleküle eine cholinbindende Region. Allerdings unterscheidet sich die Anzahl ihrer cholinbindenden Motive. Sp_{HUS}A-PspC besitzt zwölf, Sp_{HUS}B-PspC neun und D39-PspC zehn repetitive Elemente (Abb. 11). Die verschiedenen Domänen der PspC-Moleküle von Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B und D39 haben, mit Ausnahme der cholinbindenden Region sowie der prolinreichen Region, vergleichbare Längen. Dennoch sind sie von großen Sequenzunterschieden zwischen den Stämmen gekennzeichnet. In Tabelle 10 sind die Längen der verschiedenen Domänen sowie die Übereinstimmung der Proteinsequenz von Sp_{HUS}A-PspC und Sp_{HUS}B-PspC zu D39-PspC dargestellt. Besonders große Sequenzunterschiede wurden in den hypervariablen und der prolinreichen Regionen detektiert. Der N-terminale Teil (33 aa) der prolinreichen Region von Sp_{HUS}B-PspC ist deletiert. Die Vollängenproteinsequenzübereinstimmung zu D39-PspC beträgt 77,8 % für Sp_{HUS}A-PspC und 80,4 % für Sp_{HUS}B-PspC.

Um zu eruieren, welcher Subgruppe von Isotypen die PspC-Moleküle der beiden klinischen Isolate angehören, wurde deren Aminosäuresequenz mit der Proteindatenbank NCBI BLASTP 2.5.0+ (Stand 22.08.2016) abgeglichen. Sp_{HUS}A-PspC ist demnach der Subgruppe 6 zuzuordnen. Es besteht eine vollständige Übereinstimmung zu einem bereits einmalig identifizierten PspC-Molekül (NCBI: WP_000458099.1). Sp_{HUS}B-PspC ist der Subgruppe 3 zuzuordnen. Es besteht allerdings keine Übereinstimmung zu einem bereits identifizierten PspC-Molekül. Aufgrund ihrer Subgruppen-Zugehörigkeit wird Sp_{HUS}A-PspC nachfolgend als PspC6 und Sp_{HUS}B-PspC als PspC3 determiniert.

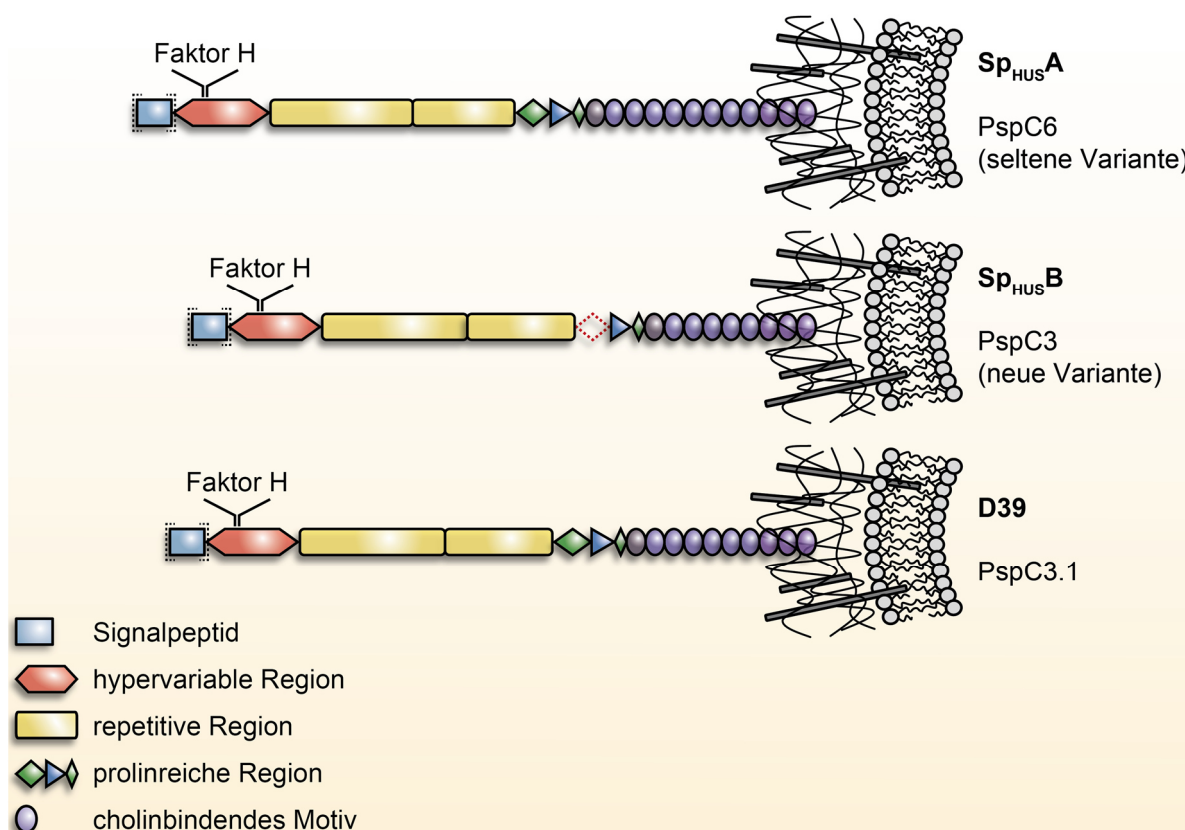


Abbildung 11: Die klinischen *S. pneumoniae*-Isolate exprimieren einen seltenen und einen unbekannten PspC-Isotypen

Schematische Darstellung der PspC-Proteine von Sp_{HUS}A (oben), Sp_{HUS}B (mittig) und D39 (unten). Die *pspC*-Gene beider klinischer Isolate wurden sequenziert, translatiert und mit der NCBI-Proteindatenbank abgeglichen. PspC von Sp_{HUS}A ist ein seltenes Mitglied der PspC-Subgruppe 6, während PspC von Sp_{HUS}B eine neue Variante der PspC-Subgruppe 3 darstellt. D39 exprimiert PspC3.1. Alle drei PspC-Moleküle besitzen ein Faktor H-bindendes Motiv (-ALNIKLASAIKTK-) und sind von unterschiedlicher Länge. Die Anzahl der cholinbindenden Motive der drei Moleküle variiert. PspC6 (Sp_{HUS}A) besitzt zwölf, PspC3 (Sp_{HUS}B) neun und PspC 3.1 (D39) zehn repetitive Elemente. Der N-terminale Teil der prolinreichen Region von PspC3 ist deletiert (rot gestrichelt).

Tabelle 10: Vergleich der Proteinsequenz von PspC6 und PspC3 mit PspC3.1 von D39

Domäne	Lokalisation und Länge der Domäne [aa]				Sequenz- übereinstimmung [%]	
	PspC6		PspC3		PspC6	PspC3
PspC (Volllänge)	1-735	735	1-644	644	77,8	80,4
Signalpeptid	1-37	37	1-37	37	91,9	100,0
hypervariable Region	38-139	102	38-136	99	45,1	71,0
repetitive Region 1	140-292	152	137-293	156	77,8	78,7
repetitive Region 2	293-402	109	294-404	110	86,8	92,1
prolinreiche Region	403-476	73	405-445	40	91,6	68,0
cholinbindende Domäne	477-735	258	446-644	198	79,5	88,4

3.3.2 PspC der beiden klinischen Stämme wurde rekombinant exprimiert

Die PspC-Moleküle der beiden klinischen Stämme wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert, um sie hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften charakterisieren zu können.

Um die Reinheit der rekombinant exprimierten PspC-Moleküle der beiden klinischen Isolate zu prüfen, wurden diese durch SDS-PAGE separiert und mittels Silberfärbung visualisiert. Rekombinantes PspC6 wurde als 105 kDa-Protein (Spur 1) und PspC3 als 110 kDa-Protein (Spur 2) detektiert. Es waren keine Degradationsfragmente der beiden Proteine im Silbergel nachweisbar (Abb. 12A). Des Weiteren waren PspC6 und PspC3 durch Western Blots mit dem PspC-spezifischem SH2-Antiserum (Abb. 12B) sowie dem His₆-Tag-spezifischen penta-His mAK (Abb. 12C) detektierbar.

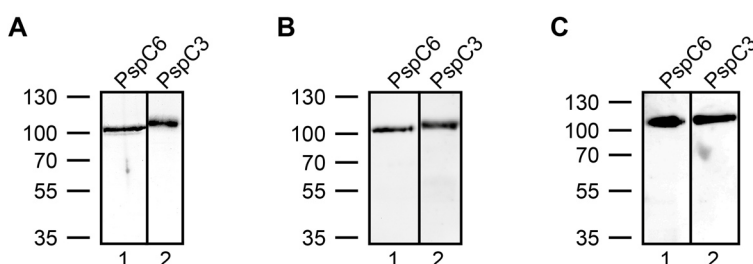


Abbildung 12: PspC von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert

PspC der beiden klinischen *S. pneumoniae*-Isolate wurde rekombinant exprimiert, aufgereinigt und hinsichtlich ihres Molekulargewichts evaluiert. Jeweils 0,5 µg PspC6 (Spur 1) und PspC3 (Spur 2) wurden mit reduzierendem Probenpuffer verkocht und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. **(A)** Silberfärbung des SDS-Acrylamidgels zur Detektion des Molekulargewichts der PspC-Proteine der klinischen Stämme. **(B)** Western Blot zur Bestimmung des PspC-Molekulargewichts der klinischen Isolate. Nach dem Plotten wurde PspC mittels SH2-Antiserum (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α -Kaninchen-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) auf der Nitrozellulosemembran detektiert. **(C)** Western Blot zur Bestimmung des Molekulargewichts der rekombinanten PspC-Moleküle. Nach dem Plotten auf die Nitrozellulosemembran wurde PspC mittels penta-His mAK (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α -Maus-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) nachgewiesen. Der Molekulargewichtsstandard ist in kDa angegeben. Mit allen drei Detektionsmethoden wurde PspC6 als 105 kDa- und PspC3 als 110 kDa-Protein detektiert.

3.4 PspC6 und PspC3 binden Faktor H und PspC-gebundenes Faktor H hat Cofaktoraktivität

PspC ist neben Tuf ein Faktor H-bindendes Protein von *S. pneumoniae* [222]. Es wurde geprüft, ob PspC der beiden klinischen Isolate Faktor H bindet und damit deren Immunevasion unterstützen könnte.

Zunächst wurde die Bindung von gereinigtem Faktor H an PspC6 und PspC3 durch ELISA evaluiert. Alle eingesetzten Proteine wurden in equimolarer Konzentration immobilisiert, um einen Vergleich der Bindungsintensität zu ermöglichen. PspC6 und PspC3 zeigen eine niedrigere Faktor H-Bindungsintensität als das PspC2.1-Fragment SH2. Der Unterschied ist dabei nur bei PspC6 und SH2 signifikant (Abbildung 13A). Wurde iNHS als

Faktor H-Quelle für den ELISA genutzt, zeigt sich der gleiche Trend. Allerdings binden sowohl PspC6 als auch PspC3 signifikant weniger Faktor H aus iNHS als SH2 (Abb. 13B). Des Weiteren wurde die Affinität von Faktor H zu PspC der beiden klinischen Isolate und SH2 mittels Bio-Layer-Interferometrie bestimmt. Der K_D -Wert der Faktor H-PspC6-Interaktion beträgt 29,4 nM (Abb. 13C). Faktor H bindet PspC3 mit einem K_D -Wert von 16,6 nM (Abb. 13D) und SH2 mit einem K_D -Wert von 6,3 nM (Abb. 13E).

Um zu überprüfen, ob PspC-gebundener Faktor H als Komplementregulator aktiv bleibt und so für die Immunevasion der klinischen Isolate von Nutzen ist, wurden Cofaktorassays durchgeführt. Dabei wurde die Funktion von Faktor H als Cofaktor für die Serumprotease Faktor I analysiert. Die Faktor I-vermittelte C3b-Spaltung wurde mittels Western Blot evaluiert. PspC6- und PspC3-gebundener Faktor H hat Cofaktoraktivität. Die Spaltprodukte der α' -Kette von C3b bei 68, 46 und 43 kDa sind detektierbar, wenn Faktor H an PspC der klinischen Isolate gebunden ist. Bei immobilisiertem BSA, welches nicht an Faktor H bindet, findet auf Grund der fehlenden Cofaktoraktivität von Faktor H keine Inaktivierung von C3b statt (Abb. 13F).

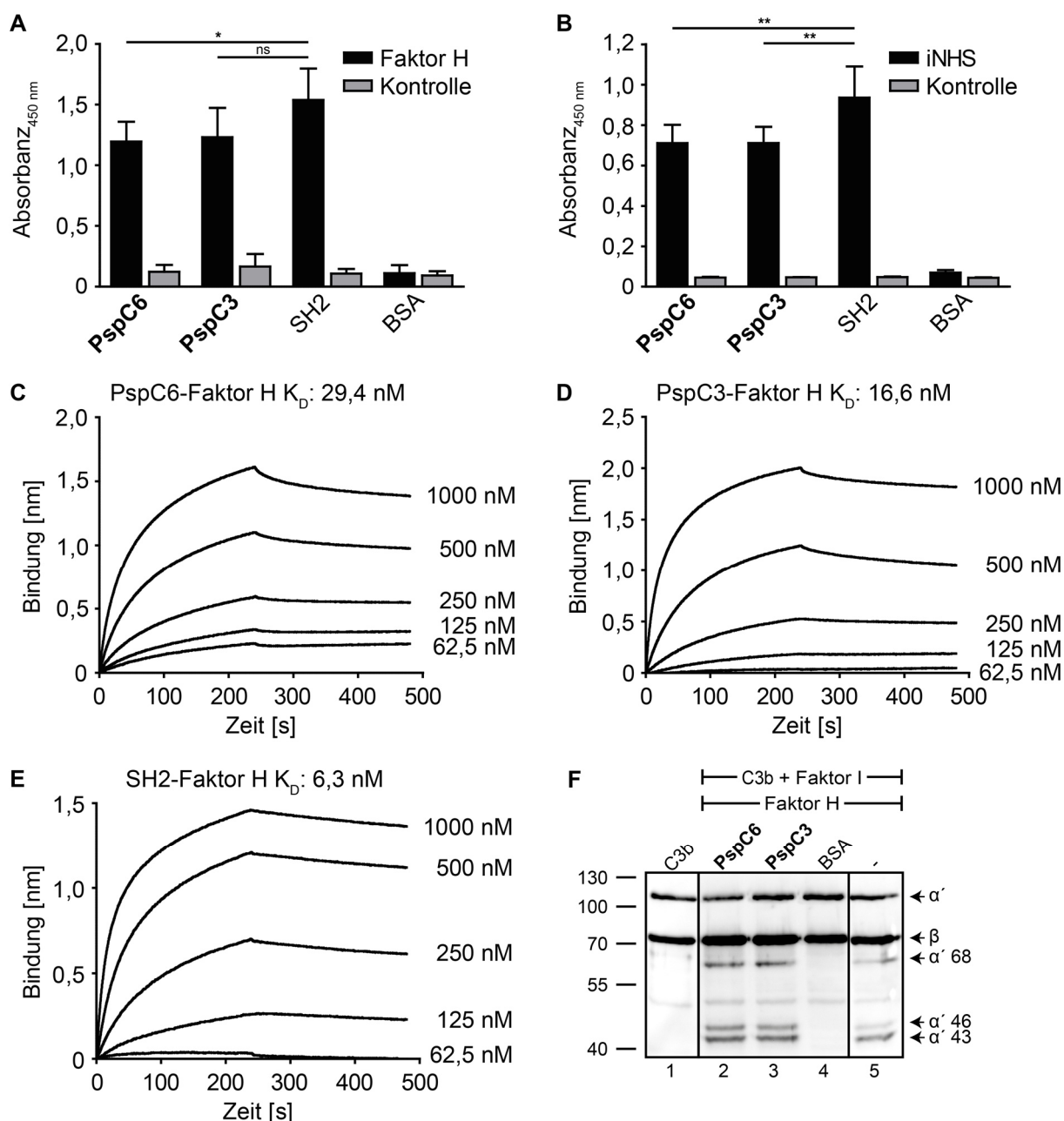


Abbildung 13: PspC der beiden klinischen Isolate bindet Faktor H und PspC-gebundener Faktor H hat Cofaktoraktivität

(A) ELISA zur Detektion der Faktor H-Bindung an rekombinant-exprimierte PspC-Moleküle. PspC6, PspC3, SH2 sowie BSA wurden auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Die Bindung von Faktor H (10 µg/ml) wurde mittels mAK T13 (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α -Maus-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) detektiert. Proben, denen kein Faktor H als Ligand zugesetzt wurde, werden als Kontrollen bezeichnet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (MW) + Standardabweichung (SD) aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Absorbanz der SH2-Probe ist signifikant höher als die der PspC6-Probe. (B) ELISA zur Detektion der Faktor H-Bindung aus iNHS an rekombinante PspC-Moleküle. Der experimentelle Ablauf gleicht dem aus Panel (A). Als Ligand wurde iNHS (25 %) eingesetzt. Die Daten repräsentieren MW + SD aus vier unabhängigen Experimenten. Die Absorbanz der SH2-Probe ist signifikant höher als die der PspC6- und der PspC3-Proben. (C) Bio-Layer-Interferometrie zur Bestimmung der Affinität der Faktor H-PspC6-Interaktion. PspC6 wurde auf einem Ni-NTA-Biosensor immobilisiert. Faktor H wurde als Analyt in den Konzentrationen 62,5, 125, 250, 500 oder 1000 nM hinzugegeben. Komplexassoziation- und dissoziation wurden jeweils 240 s verfolgt. Die Bindungssignale wurden gegen eine DPBS-Kontrolle normalisiert. Der K_D -Wert beträgt 29,4 nM. (D) Bio-Layer-Interferometrie zur Bestimmung der Affinität der Faktor H-

PspC3-Interaktion. Der experimentelle Ablauf gleicht dem aus Panel (C). PspC3 wurde auf einem Ni-NTA-Biosensor immobilisiert. Der K_D -Wert beträgt 16,6 nM. **(E)** Bio-Layer-Interferometrie zur Bestimmung der Affinität der Faktor H-SH2-Interaktion. Der experimentelle Ablauf gleicht dem aus Panel (C). SH2 wurde auf einem Ni-NTA-Biosensor immobilisiert. Der K_D -Wert beträgt 6,3 nM. **(F)** Western Blot zur Bestimmung der Cofaktoraktivität von PspC-gebundenem Faktor H. PspC6 (Spur 2), PspC3 (Spur 3) sowie BSA (Spur 4) wurden auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach der Bindung von Faktor H an die PspC Moleküle wurden C3b und Faktor I hinzu gegeben. Nach 30 min C3b-Inaktivierungsreaktion wurden die Proben unter reduzierten Bedingungen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geplottet. C3b-Spaltfragmente wurden mittels C3-Antiserum (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α -Ziegen-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) detektiert. Der Molekulargewichtsstandard ist in kDa angegeben. In PspC3- und PspC6-Proben wurden C3b-Spaltprodukte bei 68, 46 und 43 kDa, vergleichbar mit der Kontrolle in der Faktor H immobilisiert wurde (Spur 5), detektiert. Bei Immobilisation von BSA (Spur 4) oder ohne Zugabe von Faktor H und Faktor I (Spur 1) wurden keine typischen Spaltprodukte nachgewiesen.

3.5 Faktor H auf der Oberfläche von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B hat Cofaktoraktivität und reduziert Opsonisierung sowie Phagozytose

Es wurde weiterhin untersucht, ob die klinischen *S. pneumoniae*-Stämme die regulatorische Aktivität von Faktor H zur Komplementevasion nutzen.

Zur Evaluation der Komplementregulatoraktivität von Pneumokokken-gebundenem Faktor H, wurden Cofaktorassays durchgeführt. Die Spaltung von C3b durch Faktor I wurde mittels Western Blot evaluiert. Pneumokokken-gebundenes Faktor H hat Cofaktoraktivität. Die durch Faktor I generierten Spaltprodukte der α' -Kette von C3b bei 68, 46 und 43 kDa sind detektierbar, wenn Faktor H an die Pneumokokkenoberfläche gebunden ist. Die Proteinbanden der C3b-Spaltprodukte in Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B sind von höherer Intensität als beim D39-Referenzstamm und bei D39 Δ pspC. Bei immobilisiertem BSA findet keine Inaktivierung von C3b statt (Abb. 14A). Die Western Blot-Chemilumineszenzintensität des α' 68 kDa-Spaltproduktes von C3b wurde in drei unabhängigen Experimenten quantifiziert. Die Intensitäten des Degradationsproduktes sind signifikant höher in Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B im Vergleich zur D39-Referenz (Abb. 14B).

Neben der Cofaktoraktivität wurde des Weiteren untersucht, ob Pneumokokken-gebundener Faktor H die Opsonisierung der klinischen *S. pneumoniae*-Isolate durch komplementaktives, humanes Serum inhibieren kann. Nach Inkubation mit komplementaktivem NHS wurde in durchflusszytometrischen Untersuchungen weniger C3b auf der Oberfläche von Sp_{HUS}A (Δ MFI: 2795) und Sp_{HUS}B (Δ MFI: 4292) detektiert, als auf der Oberfläche von D39 (Δ MFI: 69198) und D39 Δ pspC (Δ MFI: 86608) (Abb. 14C).

Um zu prüfen, ob verringerte Opsonisierung die Phagozytose der klinischen Stämme durch neutrophile Granulozyten reduziert, wurden Phagozytoseassays durchgeführt. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der neutrophilen Granulozyten in opsonisierten Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B sind signifikant höher als die der Fresszellen in nicht

opsonisierten Proben der klinischen Stämme. Außerdem ist der MFI der Phagozyten in Proben von D39 nach Opsonisierung signifikant höher als in Proben von opsonisierten Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B (Abb. 14D).

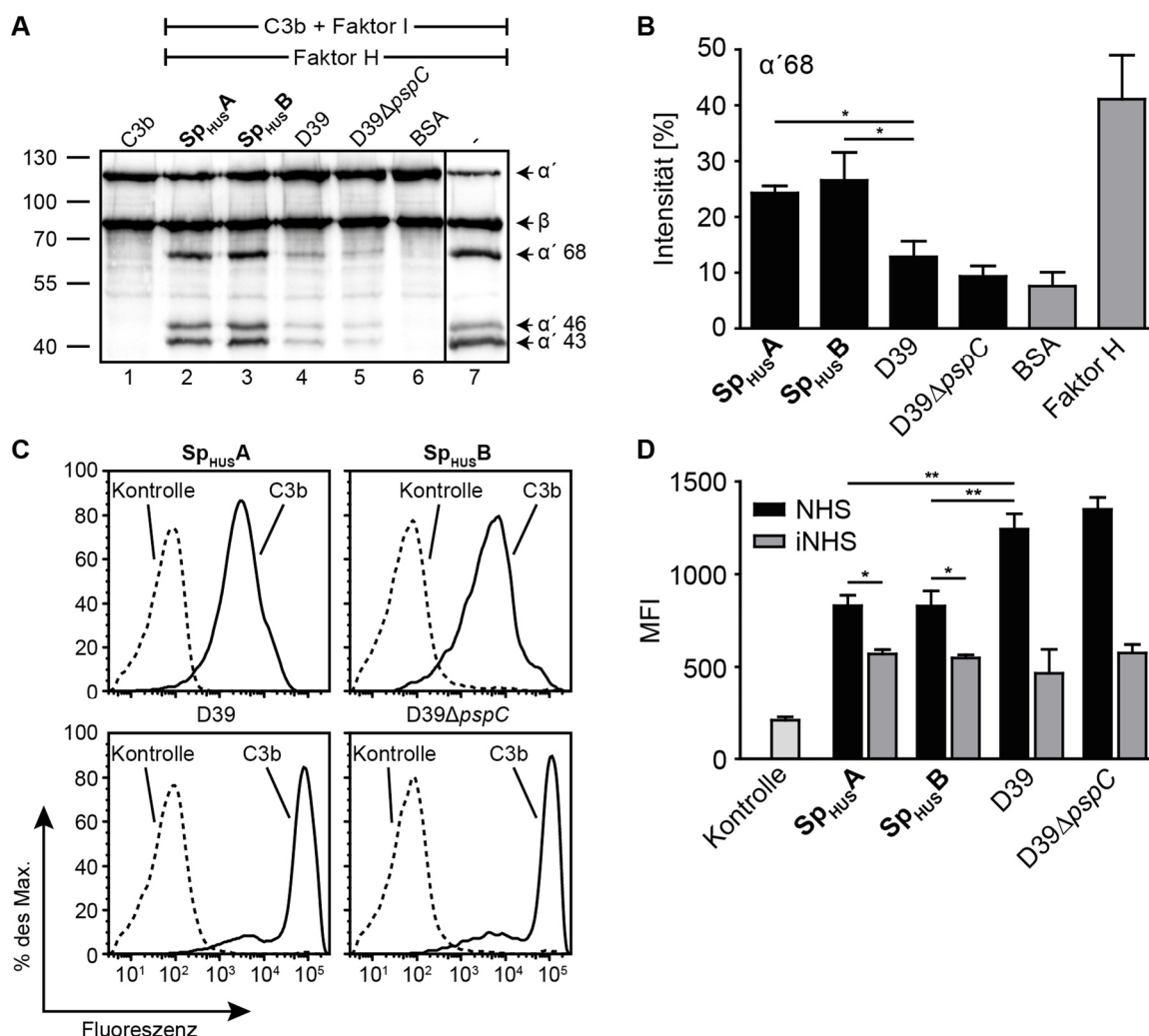


Abbildung 14: Faktor H auf der Oberfläche der klinischen Isolate hat Cofaktoraktivität und reduziert Opsonisierung sowie Phagozytose

(A) Western Blot zur Bestimmung der Cofaktoraktivität von Pneumokokken-gebundenem Faktor H. Sp_{HUS}A (Spur 2), Sp_{HUS}B (Spur 3) D39 (Spur 4), D39Δ_{pspC} (Spur 5) sowie BSA (5 µg/ml; Spur 6) wurden auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach der Bindung von Faktor H an die Pneumokokken wurden C3b und Faktor I hinzu gegeben. Nach 4 h C3b-Inaktivierungsreaktion wurden die Proben unter reduzierten Bedingungen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geplottet. C3b-Spaltfragmente wurden mittels C3-Antiserum (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α-Ziegen-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) detektiert. Der Molekulargewichtsstandard ist in kDa angegeben. In Sp_{HUS}A- und Sp_{HUS}B-Proben wurden die C3b-Spaltprodukte bei 68, 46 und 43 kDa mit höherer Intensität detektiert, als in D39- und D39Δ_{pspC}-Proben. Immobilisierter Faktor H (Spur 7) fungierte als Positivkontrolle. Bei Immobilisation von BSA oder ohne Zugabe von Faktor H und Faktor I (Spur 1) wurden keine typischen Spaltprodukte nachgewiesen. **(B)** Quantifizierung der Chemilumineszenzintensität des α'68 kDa-Degradationsprodukts von C3b. Die Intensität des α'68 kDa-Spaltprodukts wurde gegen die Intensität der stabilen β-Kette normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) + Standardabweichung (SD) aus drei unabhängigen Experimenten. Die Intensität des α'68 kDa-Spaltprodukts in Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B ist signifikant höher in Proben des D39-Referenzstammes. **(C)** Durchflusszytometrische Untersuchung zur Quantifizierung der Opsonisierung der klinischen

Isolate. Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B, D39 und D39 Δ pspC wurden mit NHS (10 %) inkubiert. Die C3b-Deposition wurde mittels α -C3d mAK (Verdünnung 1:100) und Alexa Fluor® 647-konjugiertem α -Maus-IgG pAK (Verdünnung 1:400) detektiert. Proben, denen kein NHS zugesetzt wurde, werden als Kontrollen bezeichnet. Ein repräsentatives aus fünf unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die MFI der Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B sind niedriger als die der D39-Referenz. **(D)** Durchflusszytometrische Untersuchung zur Phagozytose von Pneumokokken durch humane, neutrophile Granulozyten. Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B, D39 und D39 Δ pspC wurden in NHS (10 %) oder iNHS (10 %) inkubiert und mit *BacLight™ Green Bacterial stain* markiert. Neutrophile Granulozyten wurden mit den Pneumokokken coinkubiert. Die *BacLight™ Green Bacterial Stain*-MFI der neutrophilen Granulozyten wurde analysiert. Dargestellt ist sind MW + SD von Triplikaten eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten. Die Granulozyten-MFI der opsonisierten Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B sind signifikant höher als die der nicht opsonisierten Proben der klinischen Stämme, aber signifikant niedriger als die der opsonisierten Proben von D39.

3.6 Faktor H verstärkt die Adhäsion von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B an humane Endothelzellen

Faktor H fungiert neben seiner komplementregulatorischen Aktivität als Adhäsionsligand für humane Epithelzellen [224]. In dieser Promotion wurde eruiert, ob die klinischen *S. pneumoniae*-Stämme ihre Adhäsivität an humane Endothelzellen durch die Rekrutierung von Faktor H erhöhen. Dies stellt, in Hinblick auf die Induktion von Endothelzellschaden, einen zentralen Aspekt in der Pathologie von pHUS dar.

Um die Adhäsion der Pneumokokken an humane Endothelzellen zu quantifizieren, wurden die Bakterien fluoreszenzmarkiert und mit konfluenten HUVEC coinkubiert. Die klinischen Isolate und der virulente D39-Referenzstamm adhären mit vergleichbarer Effizienz an humane Endothelzellen. Nach Vorinkubation mit gereinigtem Faktor H oder iNHS adhären die klinischen Isolate Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B mit signifikant höherer Effizienz an die HUVEC als D39. D39 Δ pspC verhält sich unter allen getesteten Konditionen vergleichbar zu seinem Elternstamm (Abb. 15).

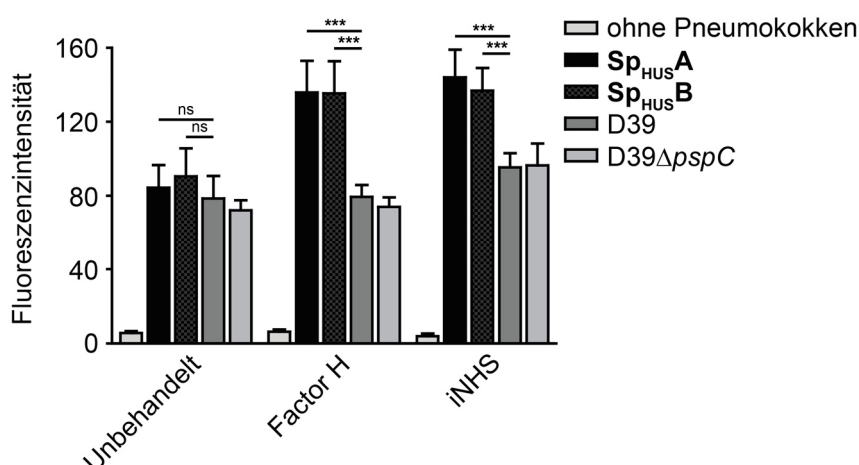


Abbildung 15: Die klinischen *S. pneumoniae*-Isolate adhären in Präsenz von Faktor H effizienter an HUVEC

Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B, D39 und D39 Δ pspC wurden mit DPBS, Faktor H (100 μ g/ml) oder iNHS (50 %) inkubiert und mit *BacLight™ Green Bacterial stain* markiert. Konfluente HUVEC wurden für 1 h in schwarzen Mikrotiterplatten und FCS-freiem Kulturmedium mit Pneumokokken inkubiert. In

Kontrollproben wurden keine Pneumokokken eingebracht. Zur Evaluation der Adhäsion der Pneumokokken wurden die Fluoreszenzsignale der HUVEC in den unterschiedlichen Vertiefungen bestimmt. Ohne Zugabe von Faktor H oder iNHS unterscheidet sich die Adhäsion von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B an HUVEC nicht von der durch die D39-Referenz. Nach Zugabe von Faktor H oder iNHS binden die klinischen Isolate effizienter an HUVEC als der virulente D39-Stamm.

3.7 Die klinischen *S. pneumoniae*-Isolate binden den humanen Komplementregulator Plasminogen an ihre Oberfläche

Plasminogen, bzw. die aktivierte Protease Plasmin, reguliert die Komplementkaskade auf Ebene der C3- und C5-Konvertase [43, 44, 73, 74]. In dieser Promotion wurde untersucht, ob die klinischen *S. pneumoniae*-Isolate Plasminogen binden und nach Aktivierung der Protease dessen komplementregulatorische Aktivität zur Immunevasion nutzen können.

Die Bindung von gereinigtem Plasminogen an Pneumokokken wurde durch *Whole cell*-ELISA evaluiert. Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B rekrutieren signifikant mehr gereinigtes Plasminogen an ihre Oberfläche als die D39-Referenz. D39 Δ pspC bindet weniger Plasminogen an seine Oberfläche als sein Elternstamm D39 (Abbildung 16A). Effizientere Bindung von Plasminogen durch Sp_{HUS}A (Δ MFI: 15794) und Sp_{HUS}B (Δ MFI: 372) im Vergleich zu D39 (Δ MFI: 134) und D39 Δ pspC (Δ MFI: 138) wurde ebenfalls mittels Durchflusszytometrie detektiert (Abb. 16B). Wurde iNHS als Plasminogen-Quelle für den *Whole cell*-ELISA genutzt, zeigt sich der gleiche Trend. Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B binden signifikant mehr Plasminogen aus iNHS als D39. D39 Δ pspC bindet weniger Plasminogen an seine Oberfläche als sein Elternstamm (Abb. 16C). Die effizientere Bindung von Plasminogen durch die klinischen Stämme (Sp_{HUS}A Δ MFI: 9817 und Sp_{HUS}B Δ MFI: 6288) im Vergleich zu D39 (Δ MFI: 616) und D39 Δ pspC (Δ MFI: 795) wurde mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen und iNHS als Plasminogen-Quelle bestätigt (Abb. 16D).

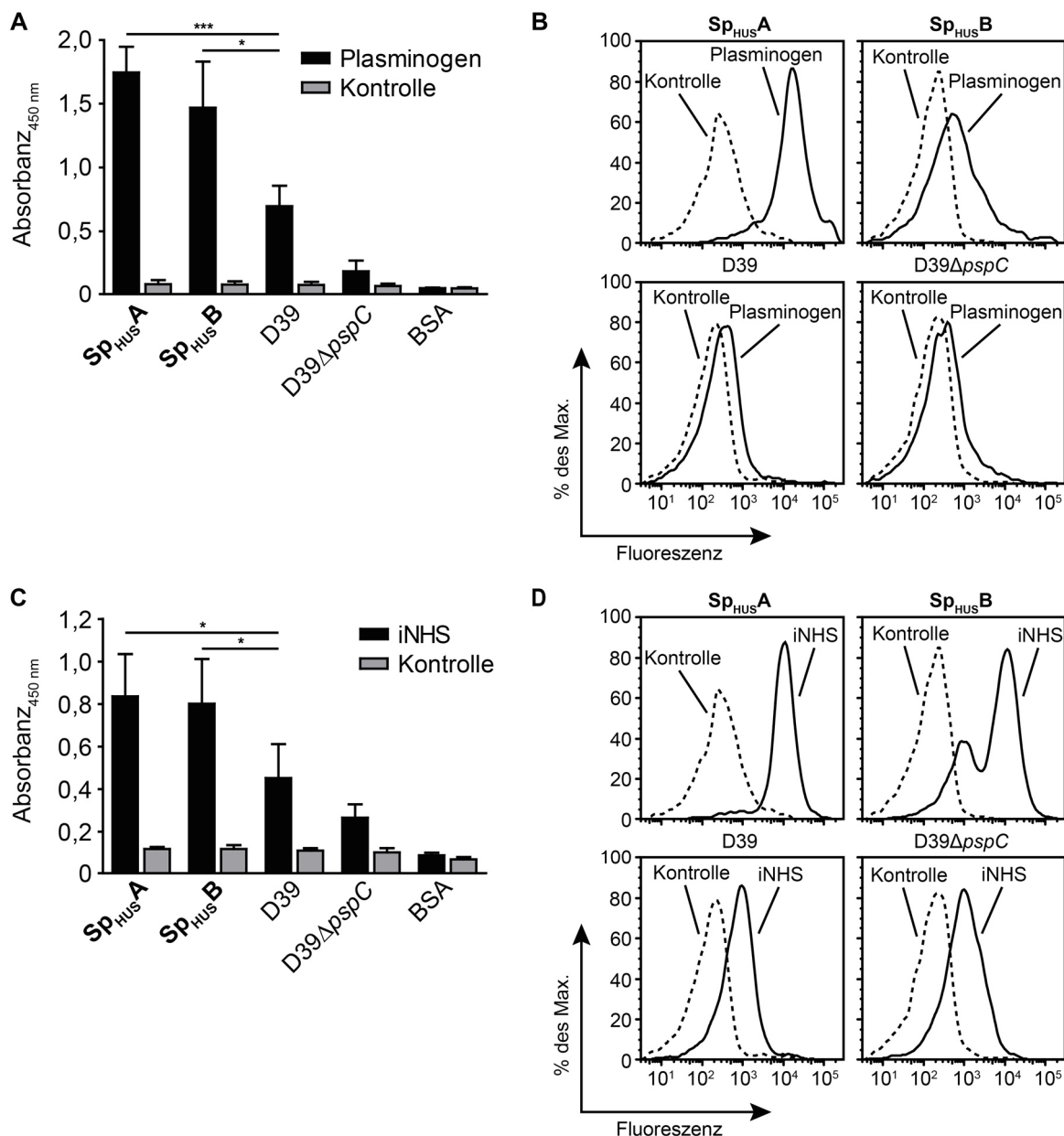


Abbildung 16: Die *S. pneumoniae*-Isolate der HUS-Patienten binden Plasminogen

(A) Whole cell-ELISA zur Detektion der Bindung von Plasminogen an die Pneumokokkenoberfläche. Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B, D39, D39ΔpspC sowie BSA (5 µg/ml) wurden auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Die Bindung von Plasminogen (10 µg/ml) wurde mittels α-Plasminogen mAK GTX79688 (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α-Ziegen-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) detektiert. Proben, denen kein Plasminogen zugesetzt wurde, werden als Kontrollen bezeichnet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (MW) + Standardabweichung (SD) aus vier unabhängigen Experimenten. Die Absorbanz der Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B ist signifikant höher als die des D39-Referenzstammes. **(B)** Durchflusszytometrische Untersuchung zur Detektion der Plasminogen-Bindung an Pneumokokken. Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B, D39 und D39ΔpspC wurden mit Plasminogen (50 µg/ml) inkubiert. Die Plasminogen-Bindung wurde mittels α-Plasminogen mAK GTX79688 (Verdünnung 1:100) und Alexa Fluor® 647-konjugiertem α-Maus-IgG pAK (Verdünnung 1:400) detektiert. Proben, denen kein Plasminogen zugesetzt wurde, werden als Kontrollen bezeichnet. Ein repräsentatives aus vier unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die MFI der Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B sind höher als die der D39-Referenz. **(C)** Whole cell-ELISA zur Detektion der Plasminogen-Bindung aus iNHS an Pneumokokken. Der experimentelle Ablauf gleicht dem aus Panel (A). Als Ligand wurde iNHS (25 %) eingesetzt. Die Daten repräsentieren MW + SD aus vier unabhängigen Experimenten. Die Absorbanz der Proben der klinischen Isolate ist

signifikant höher als die der D39-Kontrolle. **(D)** Durchflusszytometrische Untersuchung zur Detektion der Plasminogen-Bindung aus iNHS an Pneumokokken. Der experimentelle Ablauf gleicht dem aus Panel (B). Die Pneumokokken wurden mit iNHS (50 %) inkubiert. Ein repräsentatives aus vier separaten und unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die MFI der Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B sind höher als die der D39-Referenz.

3.8 PspC6 und PspC3 binden Plasminogen

Die klinischen *S. pneumoniae*-Isolate, welche große Mengen an PspC auf ihrer Oberfläche exprimieren, binden mehr Plasminogen als die D39-Referenz. Zudem rekrutiert D39 Δ pspC weniger Plasminogen als sein Elternstamm. Daraus folgend wurde PspC als neues Plasminogen-bindendes Protein von *S. pneumoniae* in Betracht gezogen.

Um PspC als Plasminogen-Liganden zu validieren, wurden zunächst ELISA mit immobilisierten, rekombinanten PspC-Molekülen und gereinigtem Plasminogen als Liganden durchgeführt. Alle eingesetzten Proteine wurden in equimolarer Konzentration immobilisiert, um einen Vergleich der Bindungsintensität zu ermöglichen. PspC6, PspC3 und SH2 binden gereinigtes Plasminogen. Es besteht kein signifikanter Unterschied der Bindungsintensität (Abbildung 17A). Wurde iNHS als Plasminogen-Quelle für den ELISA eingesetzt, bindet SH2 Plasminogen mit signifikant höherer Intensität als PspC der beiden klinischen Isolate (Abb. 17B). Des Weiteren wurde die Affinität von Plasminogen zu PspC6, PspC3 und SH2 mittels Bio-Layer-Interferometrie bestimmt. Plasminogen bindet PspC6 mit einem K_D -Wert von 568 nM (Abb. 17C) und PspC3 mit einem K_D -Wert von 489 nM (Abb. 17D). Der K_D -Wert der Plasminogen-SH2-Interaktion beträgt 1356 nM (Abb. 17E).

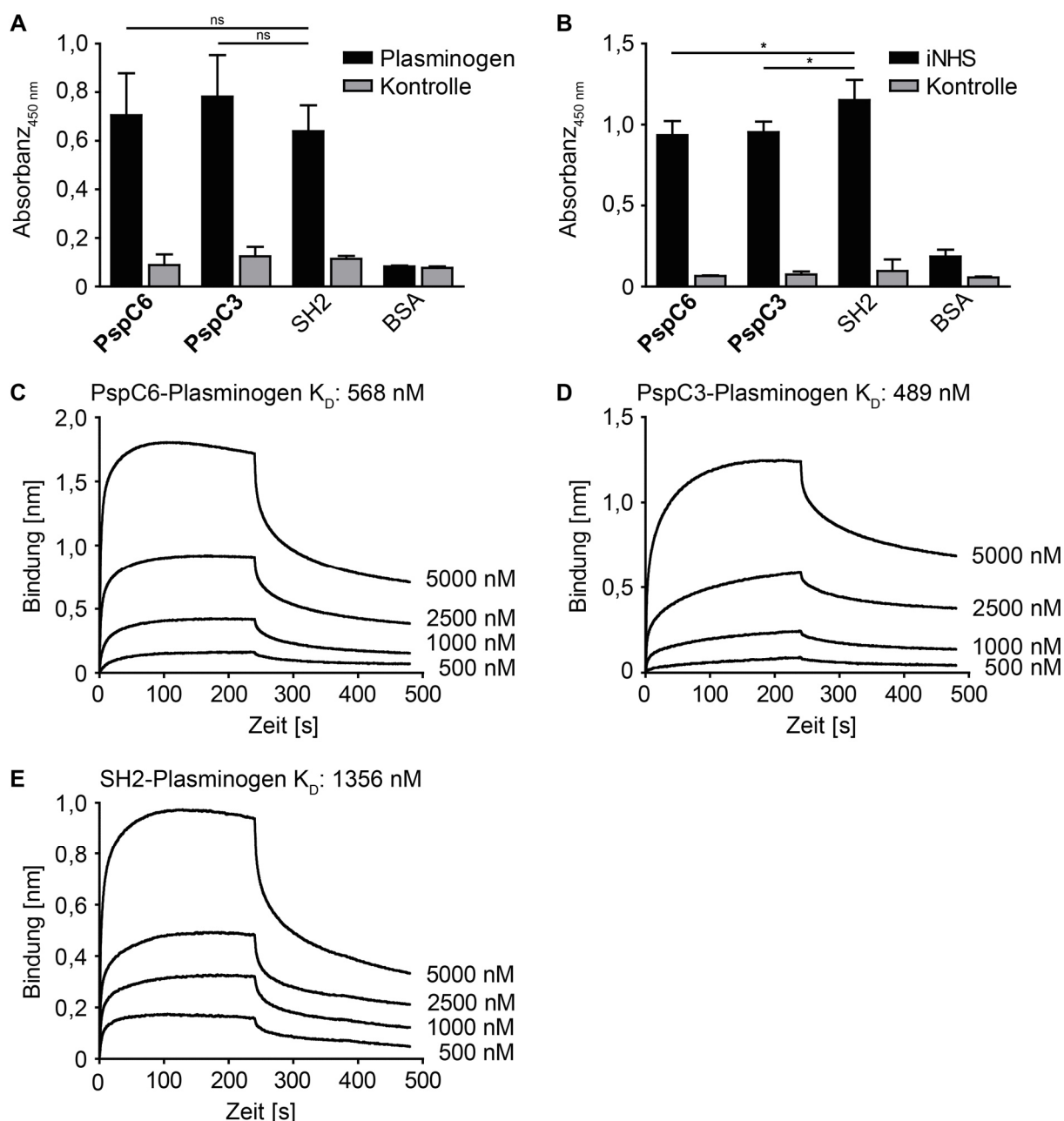


Abbildung 17: PspC der beiden klinischen Isolate bindet Plasminogen

(A) ELISA zur Detektion der Plasminogen-Bindung an rekombinantes PspC. PspC6, PspC3, SH2 sowie BSA wurden auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Die Bindung von Plasminogen (10 µg/ml) wurde mittels α-Plasminogen pAK (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α-Ziegen-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) detektiert. Proben denen kein Plasminogen zugesetzt wurde, werden als Kontrollen bezeichnet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (MW) + Standardabweichung (SD) aus drei unabhängigen Experimenten. Die Absorbanz der PspC6-, PspC3- und SH2-Proben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. **(B)** ELISA zur Detektion der Plasminogen-Bindung aus iNHS an rekombinante PspC-Moleküle. Der experimentelle Ablauf gleicht dem aus Panel (A). Als Ligand wurde iNHS (25 %) und als primärer Antikörper α-Plasminogen mAK GTX79688 (Verdünnung 1:1000) eingesetzt. Die Daten repräsentieren MW + SD aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Absorbanz der SH2-Probe ist signifikant höher als die der PspC6- und der PspC3-Proben. **(C)** Bio-Layer-Interferometrie zur Bestimmung der Affinität der Plasminogen-PspC6-Interaktion. PspC6 wurde auf einem Ni-NTA-Biosensor immobilisiert. Plasminogen wurde als Analyt in den Konzentrationen 500, 1000, 2500 oder 5000 nM hinzugegeben. Komplexassoziation- und dissoziation wurden jeweils 240 s verfolgt. Die Bindungssignale wurden gegen eine DPBS-Kontrolle normalisiert. Der K_D -Wert beträgt 568 nM. **(D)** Bio-Layer-Interferometrie zur Bestimmung der Affinität der Plasminogen-PspC3-Interaktion. PspC3 wurde auf einem Ni-NTA-Biosensor immobilisiert. Plasminogen wurde als Analyt in den Konzentrationen 500, 1000, 2500 oder 5000 nM hinzugegeben. Komplexassoziation- und dissoziation wurden jeweils 240 s verfolgt. Die Bindungssignale wurden gegen eine DPBS-Kontrolle normalisiert. Der K_D -Wert beträgt 489 nM. **(E)** Bio-Layer-Interferometrie zur Bestimmung der Affinität der Plasminogen-SH2-Interaktion. SH2 wurde auf einem Ni-NTA-Biosensor immobilisiert. Plasminogen wurde als Analyt in den Konzentrationen 500, 1000, 2500 oder 5000 nM hinzugegeben. Komplexassoziation- und dissoziation wurden jeweils 240 s verfolgt. Die Bindungssignale wurden gegen eine DPBS-Kontrolle normalisiert. Der K_D -Wert beträgt 1356 nM.

der Plasminogen-PspC3-Interaktion. Der experimentelle Ablauf gleicht dem aus Panel (C). PspC3 wurde auf einem Ni-NTA-Biosensor immobilisiert. Der K_D -Wert beträgt 489 nM. **(E)** Bio-Layer-Interferometrie zur Bestimmung der Affinität der Plasminogen-SH2-Interaktion. Der experimentelle Ablauf gleicht dem aus Panel (C). SH2 wurde auf einem Ni-NTA-Biosensor immobilisiert. Der K_D -Wert beträgt 1356 nM.

3.9 PspC-gebundenes und aktiviertes Plasmin spaltet S-2251 sowie natürliche Substrate

PspC wurde als neuer Plasminogen-Ligand von *S. pneumoniae* identifiziert. Es wurde weiterhin untersucht, ob PspC-gebundenes Plasminogen durch Aktivatoren in die Protease Plasmin konvertierbar ist und PspC-gebundenes Plasmin synthetische sowie natürliche Substrate spaltet.

Zunächst wurde die Spaltung des chromogenen Substrats S-2251 durch PspC-oder Tuf-gebundenes und aktiviertes Plasmin über einen Zeitraum von 24 h untersucht. PspC- und Tuf-gebundenes Plasminogen ist aktivierbar und spaltet S-2251 zeitabhängig. Wenn Plasmin ungebunden aktiviert wird, erfolgt die Spaltung des chromogenen Substrats schneller, als bei PspC- oder Tuf-gebundenem Plasmin. Die Umsetzung des Substrats erfolgt effizienter in Proben von PspC6- und Tuf-gebundenem Plasmin als in der Probe von PspC3-gebundenem Plasminogen (Abb. 18A).

Es wurde außerdem geprüft, ob PspC-gebundenes und aktiviertes Plasmin das natürliche Substrat Fibrinogen degradiert. Die Plasmin-vermittelte Umsetzung von Fibrinogen wurde für Zeitspannen von 1, 2, 4, 6, 18 und 24 h verfolgt und mittels Western-Blot evaluiert. PspC6- und PspC3-gebundenes und aktiviertes Plasmin degradiert Fibrinogen zeitabhängig. Proteinbanden bei 76, 72 und 50 kDa verschwinden, während Degradationsprodukte bei 45 und 40 kDa detektiert werden, vergleichbar mit der Kontrolle, in der Plasminogen immobilisiert und aktiviert wurde (Spur 9). Diese Degradationsprodukte sind bei den Fibrinogen- und BSA-Kontrollen (Spuren 1 und 8) nicht nachweisbar (Abb. 18B).

Neben Fibrinogen wurde auch die Spaltung und Inaktivierung des Komplement-Opsonins C3b durch PspC-gebundenes und aktiviertes Plasmin untersucht. Die Plasmin-vermittelte Umsetzung von C3b wurde für Zeitspannen von 1, 2, 4 und 24 h verfolgt und mittels Western-Blot analysiert. PspC6- und PspC3-gebundenes und aktiviertes Plasmin spaltet C3b zeitabhängig. Bei 68, 45, 38 und 17 kDa wurden C3b-Degradationsprodukte detektiert, vergleichbar mit der Kontrolle, in der Plasminogen immobilisiert und aktiviert wurde (Spur 7). Diese Degradationsprodukte sind bei den C3b- und BSA-Kontrollen (Spuren 1 und 6) nicht nachweisbar (Abb. 18C).

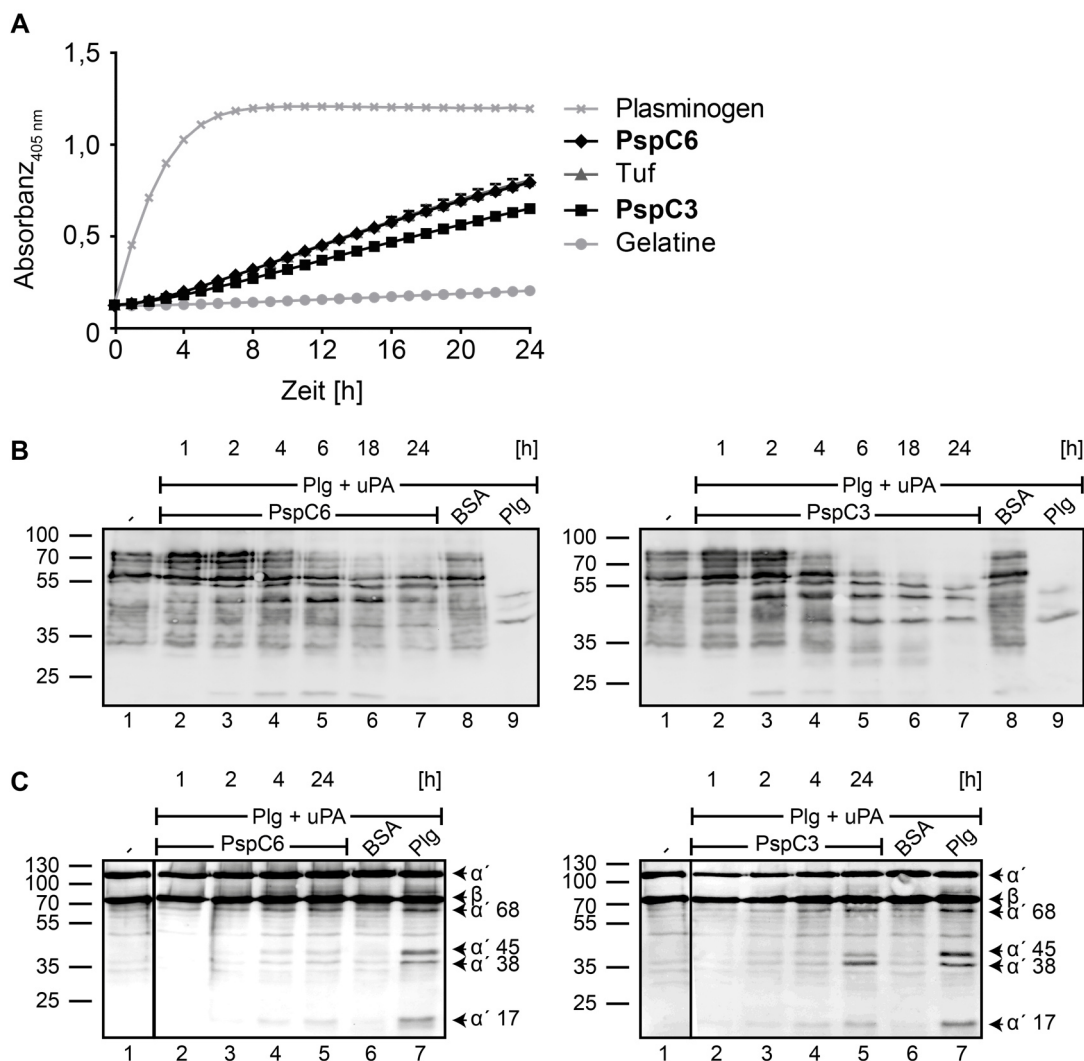


Abbildung 18: PspC-gebundenes Plasminogen wird zur Protease Plasmin aktiviert und spaltet das Chromogen S-2251 sowie natürliche Substrate

(A) Spaltung von S-2251 durch PspC-gebundenes und aktiviertes Plasmin. PspC6, PspC3, Tuf, Gelatine und Plasminogen wurden auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach der Bindung von Plasminogen (10 µg/ml) an die PspC Moleküle wurden uPA (0,4 µg/ml) und S-2251 (300 µg/ml) hinzu gegeben. Die Umsetzung des chromogenen Substrats wurde über einen Zeitraum von 24 h verfolgt. Dargestellt sind MW + SD von Triplikaten eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten. PspC- sowie Tuf-gebundenes Plasminogen wird durch uPA aktiviert und aktiviertes Plasmin spaltet S-2251 zeitabhängig. **(B)** Western Blot zur Degradation von Fibrinogen durch PspC-gebundenes und aktiviertes Plasmin. PspC6 (links) und PspC3 (rechts), BSA und Plasminogen wurden auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach der Bindung von Plasminogen (20 µg/ml) an die PspC Moleküle wurden uPA (1 µg/ml) und Fibrinogen (10 µg/ml) hinzu gegeben. Nach Zeitspannen von 1, 2, 4, 6, 18 und 24 h wurde die Umsetzung des Substrats gestoppt, die Proben mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geplottet. Fibrinogen wurde mittels Fibrinogen-Antiserum (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α -Ziegen-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) detektiert. Als Kontrolle (Spur 1) fungierte Fibrinogen welches 24 h unter den Experimentalbedingungen, aber ohne Einfluss von PspC oder Plasmin inkubiert wurde. Der Molekulargewichtsstandard ist in kDa angegeben. PspC-gebundenes und aktiviertes Plasmin wird durch uPA aktiviert und spaltet Fibrinogen zeitabhängig. Banden auf Höhe von 76, 72 und 50 kDa verschwinden, während Degradationsprodukte bei 45 und 40 kDa erscheinen, vergleichbar mit der Kontrolle, in der Plasminogen immobilisiert und aktiviert wurde (Spur 9). Bei den Fibrinogen- und BSA-Kontrollen (Spuren 1 und 8) findet keine Degradation statt. **(C)** Western Blot zur Spaltung von C3b durch PspC-

gebundenes und aktiviertes Plasmin. Der experimentelle Ablauf gleicht dem aus Panel (B). C3b (10 µg/ml) wurde als Ligand verwendet. Nach Zeitspannen von 1, 2, 4 und 24 h wurde die Umsetzung des Substrats gestoppt. C3b und dessen Spaltprodukte wurden mittels C3-Antiserum (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α -Ziegen-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) detektiert. Der Molekulargewichtsstandard ist in kDa angegeben. Degradationsprodukte erscheinen bei 68, 45, 38 und 17 kDa, vergleichbar mit der Kontrolle, in der Plasminogen immobilisiert und aktiviert wurde (Spur 7). Bei den C3b- und BSA-Kontrollen (Spuren 1 und 6) findet keine C3b-Degradation statt.

3.10 Pneumokokken-gebundenes und aktiviertes Plasmin spaltet S-2251 sowie natürliche Substrate

S. pneumoniae rekrutiert Plasminogen an seine Oberfläche. PspC wurde als neuer Plasminogen-Ligand identifiziert. PspC-gebundenes Plasminogen ist in die aktive Protease Plasmin konvertierbar und Plasmin spaltet synthetische sowie natürliche Substrate. Es wurde weiterhin eruiert, ob oberflächengebundenes Plasmin zur Komplementevasion der Pneumokokken beiträgt.

Zunächst wurde die enzymatische Spaltung des chromogenen Substrats S-2251 durch *S. pneumoniae*-gebundenes und aktiviertes Plasmin untersucht. Pneumokokken-gebundenes Plasminogen ist aktivierbar und spaltet S-2251 zeitabhängig. Wenn Plasmin ungebunden aktiviert wird, erfolgt die Umsetzung des von S-2251 schneller, als bei Pneumokokken-gebundenem Plasmin. Die Umsetzung des Substrats erfolgt effizienter in Proben von Sp_{HUS}A- und Sp_{HUS}B-gebundenem Plasmin als in Proben des virulenten D39-Referenzstammes sowie dessen PspC-*knock out*-Mutante D39 Δ pspC (Abb. 19A).

Es wurde außerdem analysiert, ob *S. pneumoniae*-gebundenes und aktiviertes Plasmin Fibrinogen degradiert. Die Plasmin-vermittelte Umsetzung von Fibrinogen wurde für Zeitspannen von 1, 2, 4, 6, 18 und 24 h verfolgt und mittels Western-Blot evaluiert. Pneumokokken-gebundenes und aktiviertes Plasmin degradiert Fibrinogen zeitabhängig. Proteinbanden bei 76, 72 und 50 kDa verschwinden, während Degradationsprodukte bei 45 und 40 kDa detektiert werden, welche mit der Kontrolle vergleichbar sind, in der Plasminogen immobilisiert und aktiviert wurde (Spur 9). In den Proben von Sp_{HUS}A-, Sp_{HUS}B- und D39-gebundenem Plasmin erfolgt die Spaltung von Fibrinogen schneller als bei der D39 Δ pspC-Probe. Bei den Fibrinogen- und BSA-Kontrollen (Spuren 1 und 8) sind keine Degradationsbanden detektierbar (Abb. 19B).

Es wurde ebenfalls die Inaktivierung von C3b durch *S. pneumoniae*-gebundenes und aktiviertes Plasmin untersucht. Die Plasmin-vermittelte Umsetzung von C3b wurde für Zeitspannen von 0,5, 1, 2, 4 und 24 h verfolgt und mittels Western-Blot analysiert. Pneumokokken-gebundenes und aktiviertes Plasmin spaltet C3b zeitabhängig. Bei 68, 45 und 38 kDa wurden C3b-Degradationsprodukte detektiert, vergleichbar mit der Kontrolle, in der Plasminogen immobilisiert und aktiviert wurde (Spur 9). Allerdings sind bei

45 kDa in den Proben von Pneumokokken-gebundenen Plasmin Doppelbanden zu erkennen. Die Umsetzung von C3b erfolgt in den Proben von Sp_{HUS}A- und Sp_{HUS}B-gebundenem Plasmin effizienter als bei den D39- und D39 Δ pspC-Proben. Bei C3b- und BSA-Kontrollen (Spuren 1 und 6), genauso wie in Proben ohne Zugabe von uPA (Spur 2) sind keine C3b-Degradationsprodukte nachweisbar (Abb. 19C).

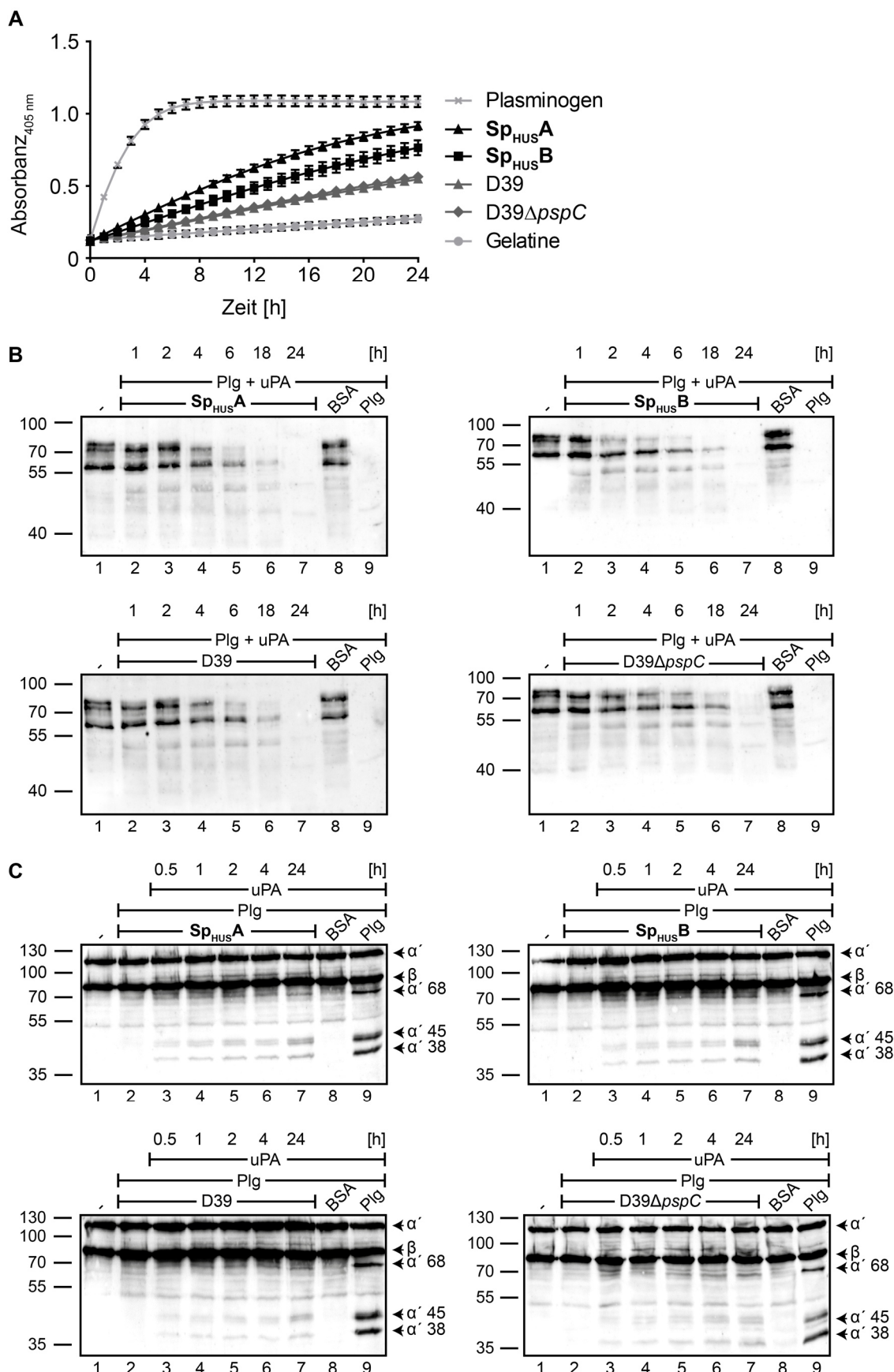


Abbildung 19: Plasminogen auf der Oberfläche der klinischen Isolate wird zur Protease Plasmin aktiviert und spaltet S-2251 sowie natürliche Substrate

(A) Spaltung von S-2251 durch Pneumokokken-gebundenes und aktiviertes Plasmin. $Sp_{HUS}A$, $Sp_{HUS}B$, D39, D39 $\Delta pspC$, Gelatine und Plasminogen wurden auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten

immobilisiert. Nach der Bindung von Plasminogen (10 µg/ml) an *S. pneumoniae* wurden uPA (0,4 µg/ml) und S-2251 (300 µg/ml) hinzu gegeben. Die Umsetzung des chromogenen Substrats wurde über einen Zeitraum von 24 h verfolgt. Dargestellt sind MW + SD von Triplikaten eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten. Pneumokokken-gebundenes Plasminogen wird durch uPA aktiviert und aktiviertes Plasmin spaltet S-2251 zeitabhängig. In Proben der klinischen Isolate erfolgt die Umsetzung des Substrats schneller als in der Probe des D39-Referenzstammes. **(B)** Western Blot zur Degradation von Fibrinogen durch *S. pneumoniae*-gebundenes und aktiviertes Plasmin. Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B, D39, D39Δ_{pspC}, BSA und Plasminogen wurden auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach der Bindung von Plasminogen (20 µg/ml) an *S. pneumoniae* wurden uPA (1 µg/ml) und Fibrinogen (10 µg/ml) hinzu gegeben. Nach Zeitspannen von 1, 2, 4, 6, 18 und 24 h wurde die Umsetzung des Substrats gestoppt, die Proben mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geplottet. Fibrinogen wurde mittels Fibrinogen-Antiserum (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α-Ziegen-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) detektiert. Als Kontrolle (Spur 1) fungierte Fibrinogen welches 24 h unter Experimentalbedingungen, aber ohne Einfluss von Pneumokokken oder Plasmin inkubiert wurde. Der Molekulargewichtsstandard ist in kDa angegeben. *S. pneumoniae*-gebundenes Plasminogen wird durch uPA aktiviert und aktiviertes Plasmin spaltet Fibrinogen zeitabhängig. Banden auf Höhe von 76, 72 und 50 kDa verschwinden, während Degradationsprodukte bei 45 und 40 kDa erscheinen, vergleichbar mit der Kontrolle, in der Plasminogen immobilisiert und aktiviert wurde (Spur 9). Bei den Fibrinogen- und BSA-Kontrollen (Spuren 1 und 8) findet keine Degradation statt. **(C)** Western Blot zur Spaltung von C3b durch Pneumokokken-gebundenes und aktiviertes Plasmin. Der experimentelle Ablauf gleicht dem aus Panel (B). C3b (10 µg/ml) wurde als Ligand verwendet. Nach Zeitspannen von 0,5, 1, 2, 4 und 24 h wurde die Umsetzung des Substrats gestoppt. C3b und dessen Spaltprodukte wurden mittels C3-Antiserum (Verdünnung 1:1000) und HRP-gekoppeltem α-Ziegen-IgG pAK (Verdünnung 1:2500) detektiert. Der Molekulargewichtsstandard ist in kDa angegeben. Degradationsprodukte erscheinen bei 68, 45 und 38 kDa, vergleichbar mit der Kontrolle, in der Plasminogen immobilisiert und aktiviert wurde (Spur 9). Bei den C3b- und BSA-Kontrollen (Spuren 1 und 8) findet keine C3b-Degradation statt.

3.11 Aktiviertes Plasmin schädigt humane Endothelzellen

Plasmin degradiert Komponenten der extrazellulären Matrix und der Basalmembran, wie Laminin, Fibrin oder Fibrinogen [70]. Außerdem spaltet Plasmin interzelluläre Verbindungen [188]. In dieser Doktorarbeit wurde untersucht, ob aktiviertes Plasmin humane Endothelzellen schädigt und dadurch zur Pathologie von HUS beiträgt.

Zur Analyse des Plasmin-vermittelten Zellschadens wurde ein konfluenter HUVEC-*Monolayer* mit aktiviertem Plasmin versetzt. Aktiviertes Plasmin reduziert die Vitalität der humanen Endothelzellen auf 23 %. Durch den Serinproteaseinhibitor Aprotinin wird die HUVEC-Schädigung signifikant inhibiert. Der Plasminogenaktivator tPA, Aprotinin oder Plasminogen reduzieren die HUVEC-Vitalität auf minimal 85 %. Triton X-100, induziert vollständige Nekrose der HUVEC (Abb. 20A).

Die Schädigung der HUVEC wurde mittels mikroskopischer Aufnahmen visualisiert. Aktiviertes Plasmin (Plg + tPA) induziert Morphologieänderungen und Ablösen von Endothelzellen aus dem intakten *Monolayer* (HUVEC Kontrolle). Aprotinin (Plg + tPA + Aprotinin) inhibiert diesen Effekt. Der Plasminogenaktivator tPA, Aprotinin oder Plasminogen

verändern die HUVEC-Morphologie nicht. Triton X-100 induziert Nekrose und damit das Abrunden und Ablösen der Endothelzellen vom subendothelialen Untergrund. (Abb. 20B).

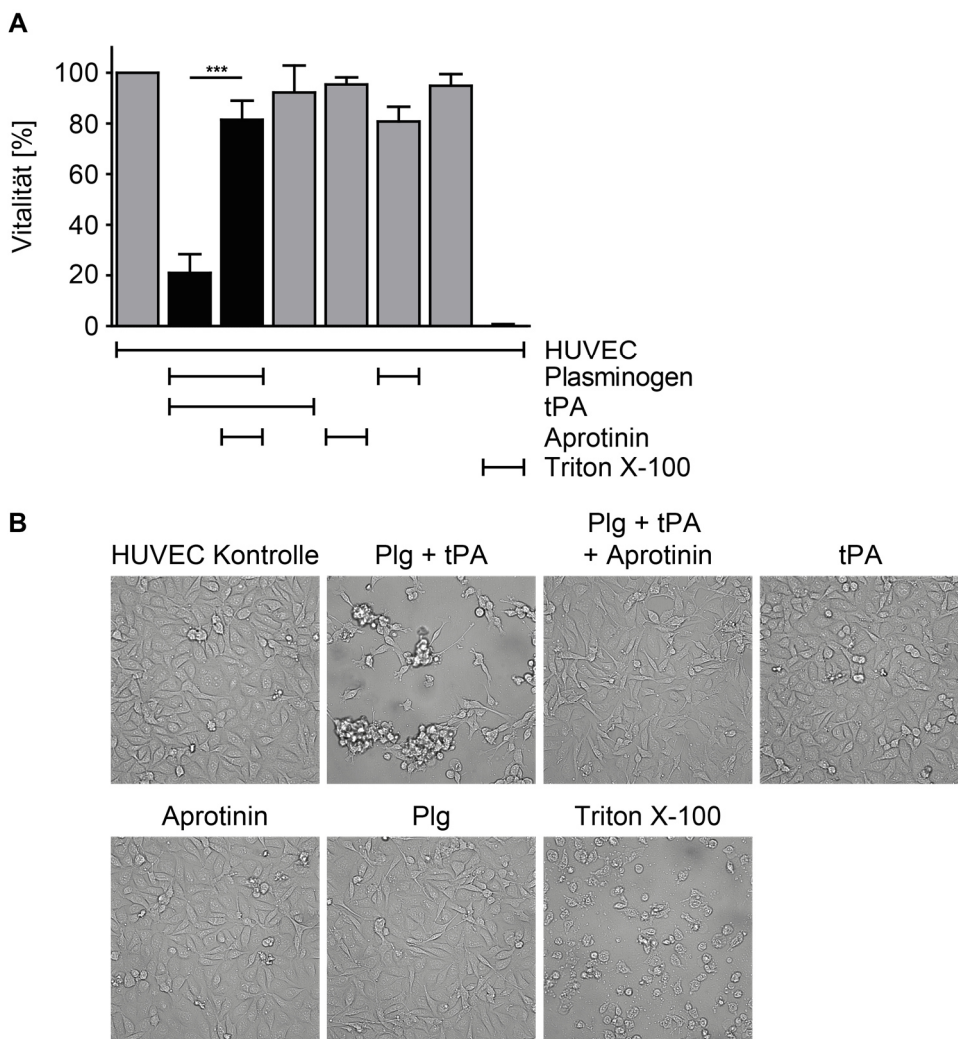


Abbildung 20: Aktiviertes Plasmin schädigt HUVEC

(A) Zytotoxizitätsassay zur Evaluierung der HUVEC-Vitalität unter Einfluss aktiviertem Plasmins. Konfluente HUVEC wurden für 24 h in Kulturmedium mit Plasminogen (200 µg/ml) und tPA (80 µg/ml) inkubiert. Mittels CellTiter-blue® wurde die LDH-Aktivität und damit die Vitalität der HUVEC quantifiziert. Aktiviertes Plasmin reduziert die HUVEC-Vitalität. Die Zugabe von Aprotinin (100 µg/ml) zum Kulturmedium inhibiert diesen Effekt. Nicht aktiviertes Plasminogen, tPA oder Aprotinin beeinflussen die HUVEC-Vitalität nicht, während Triton X-100 sie stark reduziert. **(B)** Mikroskopische Aufnahmen zur Evaluierung morphologischer Veränderungen von HUVEC durch aktiviertes Plasmin. Der experimentelle Ablauf gleicht dem aus Panel (A). Nach 24 h Kultur der HUVEC mit aktiviertem Plasmin oder Kontrollen, wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellen durchgeführt. Aktiviertes Plasmin sowie Triton X-100 verändern die Morphologie der HUVEC und induzieren die Exposition des Adhäsionsuntergrunds der Zellen. Die Zugabe von Aprotinin zum Kulturmedium inhibiert diesen Effekt. Nicht aktiviertes Plasminogen, tPA oder Aprotinin beeinflussen die HUVEC-Morphologie nicht.

3.12 Aktiviertes Plasmin auf der Oberfläche $SP_{HUS}A$ und $SP_{HUS}B$ schädigt humane Endothelzellen und exponiert die subendotheliale Matrix

Es wurde weiterhin eruiert, ob Pneumokokken-gebundenes, aktiviertes Plasmin humane Endothelzellen schädigt und dadurch zur Pathologie von pHUS beiträgt.

Plasminogen wurde an die Oberfläche von $SP_{HUS}A$ sowie $SP_{HUS}B$ gebunden und aktiviert. Anschließend wurden konfluente HUVEC mit den Plasmin-beschichteten Pneumokokken coinkubiert. $SP_{HUS}A$ sowie $SP_{HUS}B$ -gebundenes und aktiviertes Plasmin reduziert die Vitalität der humanen Endothelzellen auf 81 % bzw. 83 %. Durch Aprotinin wird die Schädigung der HUVEC signifikant inhibiert. Pneumokokken ohne Plasminogen auf der Oberfläche oder mit nicht aktiviertem Plasminogen auf der Oberfläche beeinflussen die HUVEC-Vitalität nicht (Abb. 21A).

Die Schädigung der HUVEC wurde mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen evaluiert. Zellmembranen sind rot, Zellnuklei blau und Pneumokokken grün dargestellt. Aktiviertes Plasmin auf der Oberfläche von *S. pneumoniae* induziert das Ablösen von Endothelzellen aus dem intakten *Monolayer* (obere Reihe). Es entstehen Löcher, welche die subendotheliale Matrix offenbaren. Die zellfreien Flächen im HUVEC-*Monolayer* sind größer in Proben von $SP_{HUS}A$ - und $SP_{HUS}B$ -gebundenem und aktiviertem Plasmin im Vergleich zur D39-Referenz und $D39\Delta pspC$. Aprotinin inhibiert diesen Effekt der Zellschädigung und -ablösung (mittlere Reihe). Es entstehen weniger und kleinere Löcher im *Monolayer* der Endothelzellen. Diese sind vergleichbar mit den zellfreien Flächen der Proben, in denen die HUVEC mit Pneumokokken ohne oberflächengebundenes Plasminogen inkubiert wurden (untere Reihe, Abb. 21B).

Die Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen wurden hinsichtlich der Anzahl der entstandenen Löcher sowie deren Ausdehnung bioinformatisch quantifiziert. In Proben von $SP_{HUS}A$ -, $SP_{HUS}B$ - sowie D39-gebundenem und aktiviertem Plasmin ist die Gesamtanzahl der entstandenen Löcher im HUVEC-*Monolayer* (10 Aufnahmen pro Stamm) höher als bei $D39\Delta pspC$ -gebundenem und aktiviertem Plasmin. Aprotinin reduziert die Anzahl der zellfreien Flächen bei Proben von D39- und $D39\Delta pspC$ -gebundenem und aktiviertem Plasmin auf Niveau der Kontrolle unbehandelter HUVEC. In den Proben von $SP_{HUS}A$ und $SP_{HUS}B$ ist die Inhibition weniger effektiv (Abb. 22A).

Die Fläche der einzelnen Löcher ist in den Proben von $SP_{HUS}A$ - sowie $SP_{HUS}B$ -gebundenem und aktiviertem Plasmin im Durchschnitt größer als in Proben von D39- sowie $D39\Delta pspC$ -gebundenem Plasmin. Die zellfreien Flächen in den Proben von D39 und $D39\Delta pspC$ sind durchschnittlich größer als in Proben unbehandelter HUVEC (Abb. 22B).

Des Weiteren wurde die Gesamtfläche der Löcher pro Fluoreszenzmikroskopieaufnahme analysiert. Die zellfreie Fläche im *Monolayer* der Endothelzellen ist in den Proben von $SP_{HUS}A$ - sowie $SP_{HUS}B$ -gebundenem und aktiviertem Plasmin signifikant größer als bei

der D39-Referenz und D39 Δ pspC. Die Gesamtfläche der Löcher in den Proben von D39- sowie D39 Δ pspC-gebundenem Plasmin ist größer als in der Kontrolle unbehandelter HUVEC. Aprotinin reduziert die Gesamtfläche der Löcher pro Aufnahme in den Proben von Sp_{HUS}A- sowie Sp_{HUS}B-gebundenem Plasmin signifikant auf das Niveau der Kontrolle unbehandelter HUVEC (Abb. 22C).

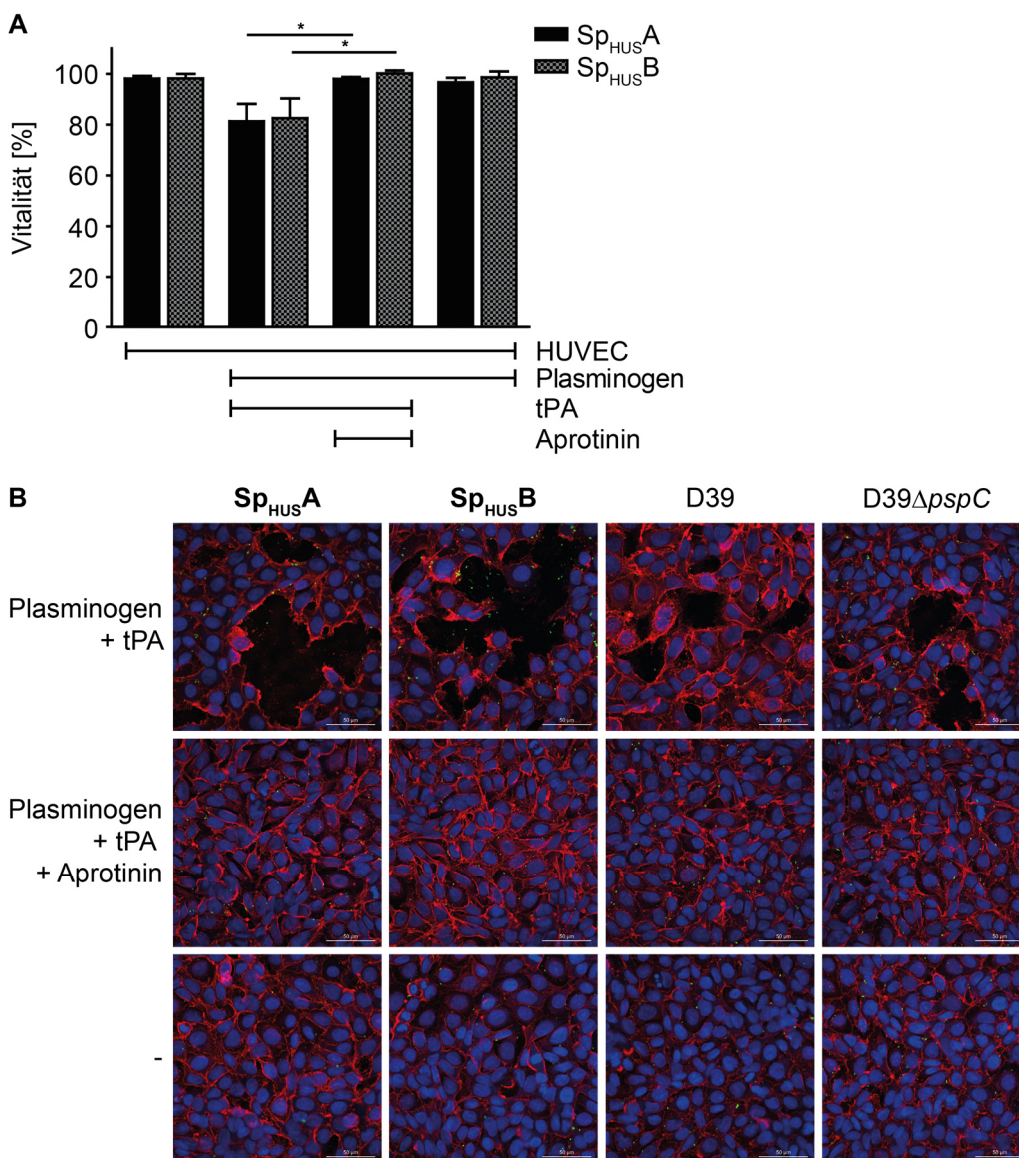


Abbildung 21: Aktiviertes Plasmin auf der Oberfläche der klinischen *S. pneumoniae*-Isolate schädigt HUVEC

(A) Zytotoxizitätsassay zur Evaluierung der HUVEC-Vitalität unter Einfluss von Sp_{HUS}A- oder Sp_{HUS}B-gebundenem und aktiviertem Plasmin. Konfluente HUVEC wurden für 24 h mit Plasminogen-beschichteten Pneumokokken und tPA (80 µg/ml) in Kulturmedium inkubiert. Mittels CellTiter-blue® wurde die LDH-Aktivität und damit die Vitalität der HUVEC quantifiziert. Aktiviertes Plasmin auf der Oberfläche von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B reduziert die HUVEC-Vitalität. Die Zugabe von Aprotinin (100 µg/ml) zum Kulturmedium inhibiert diesen Effekt. Pneumokokken ohne Plasminogen oder nicht aktiviertes Plasminogen auf der Oberfläche der Pneumokokken beeinflussen die HUVEC-Vitalität nicht. **(B)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Evaluierung morphologischer Veränderungen von HUVEC durch Pneumokokken mit oberflächengebundenem, aktiviertem Plasmin. Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B, D39 und D39 Δ pspC wurden mit FITC markiert und mit Plasminogen (200 µg/ml)

inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit tPA (80 µg/ml) in Kulturmedium aufgenommen und 1 h mit konfluenten HUVEC inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert, mit *WGA Texas Red* sowie DAPI gefärbt und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie evaluiert. Aktiviertes Plasmin auf der Oberfläche von *S. pneumoniae* verändert die Morphologie der HUVEC und induziert die Exposition des Adhäsionsuntergrunds der Zellen (obere Reihe). In Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B sind die Löcher im HUVEC-Monolayer größer als bei der des D39-Referenzstammes. Die Zugabe von Aprotinin (100 µg/ml) zum Kulturmedium inhibiert den Effekt der HUVEC-Schädigung (mittlere Reihe). Pneumokokken ohne Plasminogen beeinflussen die HUVEC-Morphologie nicht (untere Reihe).

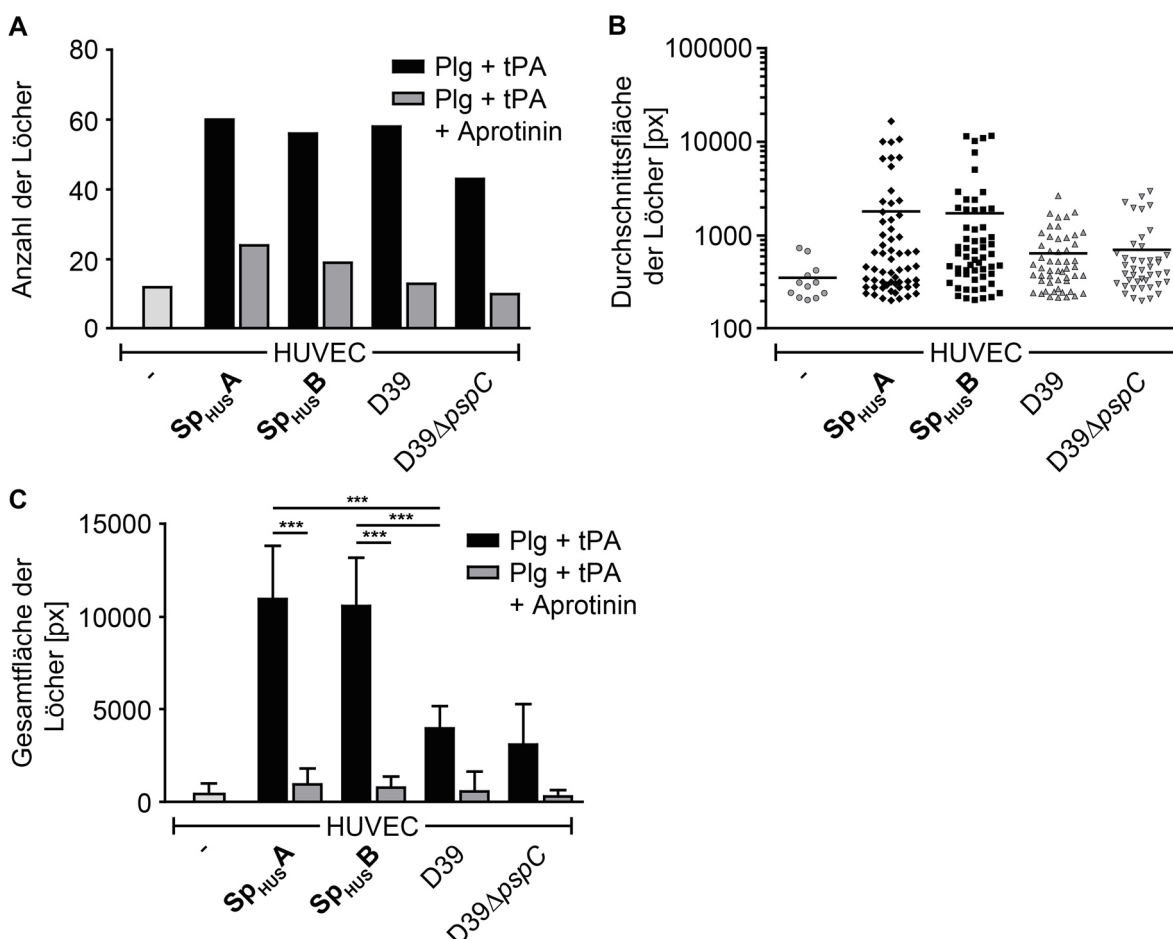


Abbildung 22: Aktiviertes Plasmin auf der Oberfläche der klinischen *S. pneumoniae*-Isolate exponiert die subendotheliale Matrix

(A) Der experimentelle Ablauf gleicht dem aus Abbildung 21B. Pro Kondition und Stamm wurden 10 Bilder mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommen und bioinformatisch analysiert. Aktiviertes Plasmin auf der Oberfläche von *S. pneumoniae* induziert die Bildung zellfreier Flächen im HUVEC-Monolayer. Die Zugabe von Aprotinin (100 µg/ml) zum Kulturmedium inhibiert den Effekt der Exposition des Adhäsionsuntergrunds. Die Daten repräsentieren die Summe aller detektierten Löcher in 10 Mikroskopieaufnahmen pro Kondition aus drei unabhängigen Experimenten.

(B) Determination der durchschnittlichen Größe zellfreier Flächen im HUVEC-Monolayer. In Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B sind die Löcher im HUVEC-Monolayer durchschnittlich größer als bei der des D39-Referenzstammes. Die Daten repräsentieren den MW aus 10 Mikroskopieaufnahmen pro Kondition aus drei unabhängigen Experimenten.

(C) Analyse der Gesamtgröße der zellfreien Flächen im HUVEC-Monolayer. In Proben von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B ist die Gesamtfläche der Löcher im HUVEC-Monolayer signifikant größer als bei der des D39-Referenzstammes. Die Zugabe von Aprotinin zum Kulturmedium reduziert die zellfreie Fläche signifikant. Die Daten repräsentieren MW + SD von 10 Mikroskopieaufnahmen pro Kondition aus drei unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

4.1 Die klinischen *S. pneumoniae*-Isolate entgehen den Attacken durch das humane Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein zentraler Bestandteil der angeborenen Immunität und hat zahlreiche, für den menschlichen Körper essenzielle Effektorfunktionen. So spielt es eine wichtige Rolle für die zelluläre Integrität, die Gewebekomöostase, die Regulation neuronaler Entwicklungsprozesse sowie für die Modifizierung der adaptiven Immunantwort und der Blutgerinnungskaskade. Vor allem stellt das Komplementsystem aber eine effiziente Verteidigung gegen in den Wirtskörper eindringende Mikroorganismen dar [8, 14-17]. Um im Wirtsorganismus überleben und sich ausbreiten zu können, haben Mikroben zahlreiche Strategien entwickelt, um den Angriffen durch das humane Komplementsystem zu entgehen. Dabei sind Oberflächen-exprimierte Virulenzfaktoren häufig von großer Bedeutung. Diese können die Komplementkaskade auf unterschiedlichen Ebenen direkt inhibieren oder die Rekrutierung humaner Komplementregulatoren ermöglichen. Die Pathogene nutzen dann deren Komplement-inhibierende Funktion zur Immunevasion. Zudem exprimieren Mikroorganismen Proteasen, welche humane Komplementkomponenten degradieren und inaktivieren [18, 19, 75, 76].

In dieser Doktorarbeit wurde die Komplementevasion der zwei klinischen *S. pneumoniae*-Stämme Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B charakterisiert. Beide Stämme wurden von sehr jungen Patienten isoliert, welche an pHUS erkrankt waren. Es sollte deshalb eruiert werden, inwiefern die beiden klinischen Isolate in der Lage sind, der humanen Komplementantwort zu entkommen, ihr Überleben zu sichern, Wirtsgewebe zu schädigen und pHUS zu induzieren.

Faktor H ist durch seine Zerfallsbeschleunigungs- und Cofaktoraktivität von zentraler Bedeutung für die Regulation der Komplementaktivierung auf C3-Ebene und damit für den Schutz humaner Wirtszellen vor überschüssiger Komplementaktivität [14]. Aufgrund seiner Schlüsselfunktion ist Faktor H besonders häufig Ziel mikrobieller Komplementevasionsstrategien [105-113]. *S. pneumoniae* binden Faktor H an die Zelloberfläche und kann so die Komplementaktivität inhibieren [112, 222, 223].

Die beiden klinischen Isolate Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B rekrutieren Faktor H mit hoher Effizienz. Die Bindung von gereinigtem Faktor H und Faktor H aus iNHS wurde mittels *Whole cell*-ELISA und durchflusszytometrischer Untersuchungen analysiert. Die beiden klinischen Stämme binden mehr gereinigten Faktor H und Faktor H aus iNHS als der virulente D39-Referenzstamm. Der D39-Stamm diente als Referenz, da dessen Fähigkeit zur Faktor H-Bindung in der Vergangenheit bereits detailliert beschrieben wurde [222, 296]. In Übereinstimmung der ELISA- und Durchflusszytometrieergebnisse bindet D39Δ*pspC* weder

gereinigten Faktor H noch Faktor H aus iNHS an seine Oberfläche. Lediglich mittels *Whole cell*-ELISA wurde eine schwache Faktor H-Bindung aus iNHS detektiert. Neben PspC exprimiert *S. pneumoniae* mit Tuf ein weiteres Faktor H-bindendes Virulenzprotein [113]. Es wäre also zu erwarten gewesen, dass D39 Δ pspC über eine Tuf-vermittelte, basale Fähigkeit zur Faktor H-Bindung verfügt. Allerdings beschreiben Mohan *et al.*, dass D39 und D39 Δ pspC nur geringe Mengen von Tuf auf der Oberfläche exprimierten und Faktor H-Bindung der pspC-Mutante nur mit Faktor H aus iNHS detektierbar ist. Die in dieser Doktorarbeit erlangten *Whole cell*-ELISA-Ergebnisse zur Faktor H-Bindung bestätigen die Resultate von Mohan *et al.* [113]. Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B rekrutieren Faktor H in großen Mengen an ihre Oberfläche. Das ermöglicht eine effiziente Komplementevasion sowie verstärkte Adhäsion an humane Zellen und steigert damit die Pathogenität der klinischen Stämme.

S. pneumoniae exprimiert zwei Faktor H-bindende Virulenzfaktoren, Tuf und PspC [113, 222]. Um zu evaluieren, welchen Beitrag diese Proteine zur Faktor H-Rekrutierung der beiden klinischen Isolate leisten, wurde deren Expression auf der Oberfläche von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B analysiert.

Tuf wurde auf der Oberfläche der beiden klinischen Stämme mittels *Whole cell*-ELISA und durchflusszytometrischer Untersuchungen nachgewiesen. Sp_{HUS}A exprimiert mehr Tuf auf der Oberfläche als D39, wodurch die Faktor H-Bindung von Sp_{HUS}A verstärkt wird. Tuf wurde außerdem in der Membranproteinfraction von Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B, D39 und D39 Δ pspC als 55 kDa-Protein detektiert. Das einheitliche Molekulargewicht des Proteins lässt bereits auf einen hohen Grad der Sequenzkonservierung schließen. Die Analyse der *tuf*-Gene aus genomischer DNA von Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B und D39 unterstützt diese Hypothese. Die detektierten *tuf*-Gene haben eine einheitliche Länge von 1,2 kbp. Die Sequenzübereinstimmung beträgt 100 % zwischen *tuf* von Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B und D39 [293]. Dieser hohe Grad der Konservierung war zu erwarten, da Tuf ein Translationelongationsfaktor ist, der als *moonlighting* Protein und Virulenzfaktor auf der Oberfläche von *S. pneumoniae* agiert. Bei der Proteinbiosynthese spielt Tuf eine wichtige Rolle in der Elongation von Polypeptidketten. Es interagiert mit der 50S-ribosomalen Untereinheit, t-RNAs sowie GDP/GTP [192, 193]. Dieser komplexe und für das Überleben von *S. pneumoniae* essenzielle Prozess erfordert einen hohen Grad an Konservierung des Tuf-Proteins.

Die beiden klinischen Isolate exprimieren ebenfalls PspC auf ihrer Oberfläche. Die Expression von PspC wurde mittels *Whole cell*-ELISA und durchflusszytometrischer Untersuchungen analysiert. Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B exponieren mehr PspC auf ihrer Oberfläche als der virulente D39-Referenzstamm. Die erhöhte PspC-Expression der beiden klinischen Isolate im Vergleich zu D39 könnte deren effizientere Faktor H-Rekrutierung erklären. Für D39 Δ pspC wurde PspC-Expression durch *Whole cell*-ELISA-Experimente aber nicht mittels

Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die schwachen Signale im ELISA sind möglicherweise durch Kreuzreaktionen des verwendeten SH2-Antiserums zu erklären. PspC ist in der MP von Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B und D39 detektierbar. In der MP von D39 Δ pspC wurde kein PspC-Protein nachgewiesen. Dies bestätigt eine mögliche Kreuzreaktion des SH2-Antiserums in den ELISA-basierenden Experimenten. Das Molekulargewicht von PspC der beiden klinischen Isolate und D39 ist unterschiedlich. Sp_{HUS}A-PspC hat eine Größe von 105 kDa, Sp_{HUS}B-PspC von 82 kDa und D39-PspC von 98 kDa. Die Analyse der *pspC*-Gene der drei Stämme verdeutlicht die Variabilität dieses Virulenzfaktors auf Genebene. Sp_{HUS}A-*pspC* hat eine Länge von 2,2 kbp, Sp_{HUS}B-*pspC* von 1,9 kbp und D39-*pspC* von 2,0 kbp. Daraus folgend unterscheiden sich die PspC-Sequenzen von Sp_{HUS}A, Sp_{HUS}B und D39.

Durch Analysen des *pspC*-Genlocus wurden bereits in der Vergangenheit große Allelvariationen zwischen unterschiedlichen *S. pneumoniae*-Stämmen festgestellt. Dies führt zu Abweichungen des Molekulargewichts von PspC. Man unterscheidet zwischen elf unterschiedlichen Subgruppen von PspC-Isotypen, welche sich in zwei Familien gliedern lassen [212, 213]. Die PspC-Moleküle der beiden klinischen Isolate besitzen eine cholinbindende Region. Sie sind damit der Familie der klassischen PspC-Moleküle (Subgruppen der Isotypen 1-6) zuzuordnen. Allerdings unterscheidet sich die Anzahl der repetitiven Elemente der cholinbindenden Region beider Proteine. Das erklärt auch die unterschiedlichen Molekulargewichte der drei PspC-Moleküle. PspC von Sp_{HUS}B (PspC3) hat dabei mit neun repetitiven Elementen die kürzeste cholinbindende Region. Zudem ist ein 33 aa-langes Peptid der prolinreichen Region von PspC3 deletiert. Damit ist es das kürzeste der drei untersuchten PspC-Moleküle. PspC der klinischen Isolate und D39 weist zahlreiche Sequenzvariation auf. Besonders große Unterschiede bestehen in den Sequenzen der hypervariablen und der prolinreichen Region. Die Sequenzübereinstimmung der Volllängenproteine zu PspC3.1 beträgt 77,8 % für PspC6 und 80,4 % für PspC3. Diese Sequenzvariationen führen mitunter zu unterschiedlichen biologischen Funktionen der Virulenzfaktoren. So bindet PspC3.1 von D39 beispielsweise C4BP [104]. Dies trifft allerdings nicht auf PspC der beiden klinischen Isolate zu [293]. PspC der beiden klinischen Stämme hat dagegen ein Faktor H-bindendes Motiv (-ALNIKLSAIKTK-) innerhalb der hypervariablen Region. Allerdings ist die Alanin-Aminosäure an Position sieben im Vergleich zum Faktor H-bindenden Motiv von D39 (-ALNIKLASAIKTK-) deletiert [225]. Dadurch ergibt sich eine Sequenzübereinstimmung des Motivs von 46,2 %.

Die Aminosäuresequenz von PspC der beiden klinischen Stämme wurde mit der Proteindatenbank NCBI BLASTP 2.5.0+ (Stand 22.08.2016) abgeglichen. PspC6 ist der Subgruppe 6 zuzuordnen. Es besteht eine vollständige Sequenzübereinstimmung zu einem bereits identifizierten PspC-Molekül (NCBI: WP_000458099.1). PspC3 ist der Subgruppe 3

zuzuordnen. Es gibt allerdings keine direkte Übereinstimmung zu einem bereits identifizierten PspC-Molekül.

Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B exprimieren die beiden Faktor H-bindenden Virulenzfaktoren Tuf und PspC auf ihrer Oberfläche. Sp_{HUS}A exprimiert mehr Tuf und beide klinischen Stämme exprimieren, im Vergleich zum D39-Referenzstamm, mehr PspC auf ihrer Oberfläche. Dies erklärt deren effizientere Faktor H-Oberflächenbindung.

Die Tuf-Sequenzen der klinischen Isolate sowie der D39-Referenz sind identisch. Deshalb bindet Tuf der verschiedenen Stämme Faktor H und andere Komplementregulatoren mit gleicher Intensität. Folglich wurden die polymorphen PspC-Moleküle der beiden klinischen Isolate in den Fokus dieser Doktorarbeit gestellt. Um die Faktor H-Bindung der PspC-Moleküle von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B im Detail zu untersuchen, wurden die beiden Proteine in *E. coli* kloniert [293], rekombinant exprimiert und aufgereinigt. Rekombinantes PspC6 wurde als 105 kDa-Protein detektiert. Dies entspricht dem erwarteten Molekulargewicht. Rekombinantes PspC3 wurde dagegen als 112 kDa-Protein detektiert. Anhand der Größe des nativen Proteins und des His₆-Tags wären ca. 84 kDa zu erwarten gewesen. Da der PspC-exprimierende *E. coli*-Stamm sowohl mittels PCR als auch durch Sequenzierung auf die korrekte Länge und Basenabfolge des inserierten *pspC*-Gens geprüft wurde [293], ist das Laufverhalten der PspC3-Bande in Silbergel und Western Blot nicht durch Sequenzvariationen zu erklären. Zudem sind keine Degradationsbanden oder Anzeichen von Aggregaten zu erkennen. Deshalb ist davon auszugehen, dass es sich um ein SDS-PAGE-abhängiges Artefakt handelt, das die folgenden Untersuchungen nicht beeinflussen sollte.

PspC von *S. pneumoniae* bindet den humanen Komplementregulator Faktor H [222, 223, 297]. Als Faktor H-bindendes Motiv wurde -ALNIKLASAIKTK- in der hypervariablen Region identifiziert [225]. Bei PspC3 und PspC6 ist die Alanin-Aminosäure an Position sieben des Motivs deletiert. Folglich wurde eruiert, ob die beiden PspC-Moleküle Faktor H dennoch binden. Sowohl PspC3 als auch PspC6 binden Faktor H spezifisch. Die Bindung von gereinigtem Faktor H und Faktor H aus iNHS wurde mittels ELISA evaluiert. PspC6 und PspC3 binden Faktor H mit geringerer Intensität als SH2, welches bereits als Faktor H-bindendes PspC-Fragment des Isotyps 2.1 beschrieben wurde [224]. Die K_D -Werte der Faktor H-PspC6-Interaktion (29,4 nM) und Faktor H-PspC3-Interaktion (16,6 nM) sind höher als der K_D -Wert der Faktor H-SH2-Interaktion (6,3 nM). Da sich der K_D -Wert reziprok zu Bindungsaffinität verhält, bindet PspC der beiden klinischen Stämme Faktor H mit niedrigerer Affinität als SH2. Damit bestätigen die ermittelten Bindungsaffinitäten die ELISA-Ergebnisse. Die verringerte Faktor H-Bindungsaffinität von PspC6 und PspC3 könnte auf das verkürzte Faktor H-bindende Motiv der beiden PspC-Moleküle zurückzuführen sein.

Dennoch binden die beiden klinischen Stämme Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B mehr Faktor H an ihre Oberfläche als die virulente D39-Referenz. Da Tuf im Vergleich zu PspC einen deutlich geringeren Anteil der Faktor H-Bindung an die Pneumokokkenoberfläche ausmacht [113], ist folglich die starke PspC-Oberflächenexpression der klinischen Isolate im Vergleich zum D39-Referenzstamm für die effiziente Faktor H-Rekrutierung zu verantworten.

PspC3 und PspC6 binden Faktor H. Folglich wurde geprüft, ob PspC-gebundener Faktor H seine Aktivität als Cofaktor für Faktor I bewahrt und durch Unterstützung der Inaktivierung von C3b, des zentralen Opsonins des Komplementsystems, die Komplementevasion der beiden klinischen *S. pneumoniae*-Isolate begünstigt. PspC6- und PspC3-gebundener Faktor H hat Cofaktoraktivität. In Cofaktorassays wird die α' -Kette von C3b gespalten. Dabei entstehen die typischen Spaltprodukte bei 68, 46 und 43 kDa. Diese Spaltprodukte sind nicht detektierbar, wenn der Reaktion Faktor H (BSA-Kontrolle) oder Faktor I (Daten nicht gezeigt) entzogen werden. Folglich kann eine Faktor H-unabhängige Aktivität von Faktor I sowie eine PspC-vermittelte Spaltung von C3b ausgeschlossen werden.

PspC-gebundener Faktor H hat Cofaktoraktivität. Deshalb wurde weiterführend geprüft, ob die komplementregulatorische Aktivität von Faktor H auch nach der Bindung an Pneumokokken bestehen bleibt. *S. pneumoniae*-gebundenes Faktor H hat Cofaktoraktivität. Die Umsetzung von C3b erfolgt effizienter bei Faktor H-beschichteten Sp_{HUS}A sowie Sp_{HUS}B als bei Faktor H- beschichtetem D39. Dies liegt in der verstärkten Bindung von Faktor H der beiden klinischen Isolate im Vergleich zum virulenten D39-Referenzstamm begründet. Befindet sich mehr Faktor H auf der Oberfläche der Pneumokokken, wird die Faktor I-vermittelte Spaltung von C3b besser unterstützt.

Die Inaktivierung des Opsonins C3b durch Faktor I und Faktor H ist ein zentraler Mechanismus, um die Amplifikationsschleife der Komplementkaskade zu unterbrechen und damit Wirtszellen vor überschüssiger Komplementaktivität zu schützen [14]. Pneumokokken nutzen diese Fähigkeit von Faktor H, die Faktor I-vermittelte Inaktivierung als Cofaktor zu unterstützen, um ihre Opsonisierung und Opsonophagozytose durch neutrophile Granulozyten zu unterdrücken [112]. Durch die effiziente Bindung von aktivem Faktor H an die Oberfläche der beiden klinischen *S. pneumoniae*-Isolate werden Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B in Gegenwart von komplementaktivem, humanem Serum weniger stark opsonisiert. Die C3b-Deposition auf der Oberfläche der klinischen Stämme ist geringer als auf der Oberfläche des D39-Referenzstammes. Des Weiteren werden Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B weniger effizient durch neutrophile Granulozyten phagozytiert als D39. Die Phagozytose aller untersuchten Pneumokokken-Stämme ist nach Inkubation in komplementinaktivem iNHS verringert. Daraus folgend ist die Phagozytose von *S. pneumoniae* abhängig von der Opsonisierung der Bakterien durch komplementaktives NHS. Sowohl Opsonisierung als auch

Opsonophagozytose von D39 Δ pspC sind im Vergleich zur D39-Referenz erhöht. In Übereinstimmung mit der im Vergleich zum D39-Referenzstamm verringerten Opsonisierung und Phagozytose der beiden klinischen Isolate, unterstützt dies die Hypothese, dass PspC-vermittelte Faktor H-Bindung Opsonisierung und Opsonophagozytose vermindert.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass die beiden klinischen *S. pneumoniae*-Stämme Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B den zentralen, humanen Komplementregulator Faktor H effizienter an ihre Oberfläche binden, als der D39-Referenzstamm. Dies ist vor allem auf eine im Vergleich zu D39 verstärkte PspC-Oberflächenexpression zurückzuführen. PspC- und Pneumokokken-gebundenes Faktor H ist komplementregulatorisch aktiv und inhibiert komplementvermittelte Opsonisierung und Opsonophagozytose der klinischen Isolate durch neutrophile Granulozyten. Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B entkommen folglich der Komplementattacke und deren Effektorfunktionen, welche von zentraler Bedeutung für die angeborene Immunität des Menschen sind. Die klinischen Stämme können dadurch länger im Wirtskörper persistieren, sich vermehren und Schaden anrichten (Abb. 24).

4.2 Die klinischen *S. pneumoniae*-Isolate adhären effizient an humane Endothelzellen

Die Schädigung des mikrovaskulären Endotheliums, welches zur Exposition subendothelialer Komponenten führt und ein prothrombotisches Milieu induziert, wird als primäres Ereignis bei der Entstehung von HUS betrachtet [230, 231]. Es ist zudem bekannt, dass Faktor H-Rekrutierung *S. pneumoniae* eine effizientere Adhäsion an humane Epithelzellen ermöglicht [224]. Die beiden klinischen *S. pneumoniae*-Stämme binden Faktor H effizient an ihre Oberfläche. In dieser Doktorarbeit wurde weiterführend untersucht, ob Faktor H-Rekrutierung ebenfalls die Adhäsion von Pneumokokken an humane, vaskuläre Endothelzellen verbessert. Diese kleiden die Blutgefäße des Menschen aus. Adhärert *S. pneumoniae* effizienter an Endothelzellen, erhöht dies die Wahrscheinlichkeit der Schädigung der humanen Zellen durch etwaige Virulenzmechanismen der Pneumokokken und damit die Wahrscheinlichkeit der Ausprägung von pHUS.

Die beiden klinischen Isolate Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B sowie D39 adhären an humane, vaskuläre Endothelzellen. Nach Inkubation mit Faktor H adhären Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B stärker an die HUVEC als D39. Diese effizientere Bindung der klinischen Isolate an die humanen Endothelzellen wird erst nach Inkubation mit Faktor H evident.

Es ist zu konstatieren, dass Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B nach Kontakt mit Faktor H effizienter an HUVEC adhären als der virulente D39-Referenzstamm. Die erhöhte Adhäsivität der beiden klinischen Stämme ist auf deren effiziente Faktor H-Rekrutierung zurückzuführen.

Dadurch wird der Kontakt der klinischen Isolate mit humanen, vaskulären Endothelzellen verstärkt. Sie haben damit ein erhöhtes Potenzial, die Wirtszellen zu schädigen (Abb. 23).

4.3 Die klinischen *S. pneumoniae*-Isolate induzieren pHUS durch Plasmin-vermittelte Schädigung von humanen Endothelzellen

Plasmin ist ein Schlüsselenzym des Koagulationssystems [43, 67, 68]. Es inhibiert die Blutgerinnung und induziert die Fibrinolyse [69]. Außerdem reguliert Plasmin die Wundheilung, Geweberemodellierung, Angiogenese und Tumormetastasierung [72]. Plasmin fungiert weiterhin als Regulator des Komplementsystems, durch Spaltung und Inaktivierung der zentralen Komplementproteine C3b und C5 [43, 44, 73, 74]. *S. pneumoniae* rekrutiert Plasminogen an seine Oberfläche. Das ermöglicht den Bakterien die Proteaseaktivität von Plasmin einerseits zur Degradation der EZM zu nutzen und damit Transmigration sowie Kolonisierung zu fördern und andererseits die Komplementkaskade auf C3- sowie C5-Ebene zu unterdrücken, um Angriffen durch das humane Komplementsystem zu entgehen [113, 186-188]. Ein erklärtes Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Bindung von Plasminogen an die klinischen *S. pneumoniae*-Isolate zu charakterisieren.

Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B rekrutieren Plasminogen mit hoher Effizienz an ihre Oberfläche. Die Bindung von gereinigtem Plasminogen und Plasminogen aus iNHS wurde mittels *Whole cell*-ELISA und Durchflusszytometrie analysiert. Die beiden klinischen Isolate rekrutieren mehr Plasminogen als der virulente D39-Referenzstamm. Effiziente Bindung von Plasminogen an die Oberfläche von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B ermöglicht den Bakterien die Proteaseaktivität von Plasmin zur Komplementevasion sowie Wirtskolonisierung effektiver zu nutzen und steigert die Pathogenität der klinischen Stämme.

Die effiziente Plasminogen-Bindung der klinischen Isolate und die verminderte Plasminogen-Bindung von D39Δ*pspC* im Vergleich zu seinem Elternstamm lassen vermuten, dass PspC an der Plasminogen-Bindung von Pneumokokken beteiligt ist. Derzeit sind fünf Plasminogen-bindende Proteine von *S. pneumoniae* bekannt, CbpE, GAPDH, Enolase, Endopeptidase O, Phosphoglyceratkinase und Tuf [43, 113, 173, 186, 187, 298, 299]. In dieser Doktorarbeit wird PspC erstmals als Plasminogen-bindender Virulenzfaktor von *S. pneumoniae* identifiziert. Sowohl PspC3 als auch PspC6 binden gereinigtes Plasminogen und Plasminogen aus iNHS. Die K_D-Werte der Plasminogen-PspC6-Interaktion (568 nM) und der Plasminogen-PspC3-Interaktion (489 nM) sind niedriger als der K_D-Wert der Plasminogen-SH2-Interaktion (1356 nM). PspC der beiden klinischen Isolate bindet also mit höherer Affinität an Plasminogen als SH2. Da PspC6 und PspC3 Plasminogen binden, erhöht die verstärkte PspC-Oberflächenexpression der beiden klinischen Isolate, im Vergleich zur D39-Referenz, folglich deren Potenzial zu Plasminogen-Rekrutierung.

Es wurde weiterführend untersucht, ob PspC-gebundenes Plasminogen zur Protease Plasmin konvertierbar ist und PspC-gebundenes Plasmin aktiv ist. PspC-gebundenes Plasminogen ist durch humane Plasminogenaktivatoren zu Plasmin konvertierbar. PspC-gebundenes und aktiviertes Plasmin spaltet das Chromogen S-2251 sowie die natürlichen Substrate Fibrinogen und C3b. Die Umsetzung der Substrate erfolgt, verglichen mit ungebundenen Plasmin, langsamer, wenn Plasmin an PspC gebunden ist. Es gilt allerdings zu bedenken, dass dieser Effekt lediglich dem Fakt geschuldet ist, dass, selbst bei gleicher eingesetzter Konzentration, weniger Plasminogen an PspC bindet als auf einer Mikrotiterplattenvertiefung immobilisierbar ist. Auffällig ist außerdem, dass bei der Spaltung von C3b die Degradationsprodukte von 68, 45, 38 und 17 kDa entstehen. Barthel *et al.* beschrieben ebenfalls die Spaltprodukte bei 68 und 17 kDa, allerdings abweichende Produkte bei 40 und 30 kDa. Unabhängig der genauen Größe der detektierten C3b-Fragmente, findet dennoch eine Spaltung der α' -Kette von C3b und damit die Inaktivierung des Opsonins statt.

PspC-gebundenes Plasminogen ist aktivierbar und PspC-gebundenes, aktiviertes Plasmin spaltet synthetische sowie natürliche Substrate. Damit kann Plasmin zur Komplementevasion und Wirtskolonisierung der beiden klinischen Stämme beitragen. Deshalb wurde weiterführend eruiert, ob die Plasmin-Funktion auch nach Bindung an Pneumokokken erhalten bleibt. Pneumokokken-gebundenes Plasminogen ist durch humane Plasminogenaktivatoren zu Plasmin konvertierbar. *S. pneumoniae*-gebundenes und aktiviertes Plasmin spaltet das Chromogen S-2251 sowie die natürlichen Substrate Fibrinogen und C3b. Bei der Degradation von C3b durch Pneumokokken-gebundenes Plasmin sind, vergleichbar mit den Experimenten zur C3b-Inaktivierung durch PspC-gebundenes Plasmin, Spaltprodukte bei 68, 45 und 38 kDa nachweisbar. Es handelt sich also bei den zuvor diskutierten 45 und 38 kDa-Degradationsbanden keinesfalls um Artefakte. Weiterhin sind auf Höhe von 45 kDa in Proben von *S. pneumoniae*-gebundenem Plasmin Doppelbanden zu erkennen. Wie diese entstehen, ist unklar. Proteolytische Aktivität durch die Pneumokokken ist allerdings ausgeschlossen, da in Proben, in denen Pneumokokken-gebundenes Plasminogen nicht durch uPA aktiviert wurde, keine C3b-Spaltprodukte detektierbar sind. Die Umsetzung des synthetischen Substrates S-2251 sowie des natürlichen Substrates C3b erfolgt effizienter in Proben von Sp_{HUS}A- und Sp_{HUS}B-gebundenem Plasmin als in Proben des D39-Referenzstammes sowie von D39 Δ pspC. Die Degradation von Fibrinogen erfolgt in den Proben von Sp_{HUS}A-, Sp_{HUS}B- und D39-gebundenem Plasmin schneller als bei der D39 Δ pspC-Probe. Die beiden klinischen Stämme rekrutieren mehr Plasminogen an ihre Oberfläche als die virulente D39-Referenz und die Plasminogen-Bindung von D39 Δ pspC ist im Vergleich zu seinem Elternstamm reduziert. Folglich korreliert die Menge von gebundenem Plasminogen mit der Umsetzung der

synthetischen und natürlichen Plasmin-Substrate. Die beiden klinischen Stämme Sp_{HUS}A- und Sp_{HUS}B können also im Vergleich zur D39-Referenz die Proteaseaktivität von Plasmin effizienter nutzen, damit ihre Transmigration sowie Kolonisierung unterstützen und die Aktivierung der Komplementkaskade inhibieren, um Angriffen durch das humane Komplementsystem zu entgehen.

Plasmin degradiert Komponenten der extrazellulären Matrix und der Basalmembran, wie Laminin, Fibrin oder Fibrinogen und ist damit in die Migration eukaryotischer Zellen involviert [70, 71]. Durch Aktivierung von Metalloproteasen und Elastase beeinflusst Plasmin außerdem Geweberemodellierung [72]. Pneumokokken-gebundenes Plasmin spaltet zudem interzelluläre Verbindungen und unterstützt dadurch die Transmigration sowie Wirtskolonisierung der Bakterien [188]. In Hinblick auf die Pathogenese von HUS wurde dieser Doktorarbeit untersucht, ob Plasmin humane, vaskuläre Endothelzellen schädigt und dadurch subendotheliales, thrombogenes Material exponiert. Aktiviertes Plasmin reduziert die Vitalität von humanen Endothelzellen auf weniger als 25 %. Der Serinproteaseinhibitor Aprotinin inhibiert diese Plasmin-vermittelte Zellschädigung und hebt die Zellvitalität auf über 80 %. Die Wirkung des Serinproteaseinhibitors, aber auch die Tatsache, dass nicht aktiviertes Plasminogen, tPA oder Aprotinin allein keine Reduktion der HUVEC-Vitalität verursachen, bestätigt, dass die Schädigung der HUVEC durch die Plasmin-Proteaseaktivität induziert wird. Plasmin induziert mikroskopisch-evidente, morphologische Veränderungen der humanen Endothelzellen sowie ein Ablösen der HUVEC vom Untergrund, wodurch subendotheliale Bereiche exponiert werden.

Aktiviertes Plasmin schädigt humane, vaskuläre Endothelzellen und induziert die Exposition des subendothelialen Untergrunds. Plasmin ist dadurch in der Lage, ein prothrombotisches Milieu zu schaffen, welches zur Aktivierung von Thrombozyten, Bildung intraluminaler Thromben, Hämolyse, Nierenschädigung und damit zur Ausprägung von HUS führen kann. In dieser Studie wurde deshalb weiterführend eruiert, ob Pneumokokken-gebundenes und aktiviertes Plasmin humane, vaskuläre Endothelzellen schädigt, subendotheliale Bereiche exponiert und dadurch pHUS induziert. Sp_{HUS}A- und Sp_{HUS}B-gebundenes, aktiviertes Plasmin schädigt HUVEC. Dieser Effekt wird durch die Plasmin-Proteaseaktivität vermittelt, da Aprotinin die Schädigung der HUVEC inhibiert und nicht aktiviertes, Pneumokokken-gebundenes Plasminogen sowie unbehandelte Pneumokokken keinen Effekt auf die HUVEC-Vitalität haben. In Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen wird deutlich, dass Pneumokokken-gebundenes, aktiviertes Plasmin die Ausbildung von Löchern in dem *Monolayer* aus humanen Endothelzellen verursacht. Diese entstehen durch morphologische Veränderungen und Ablösen der HUVEC. Unbehandelte Pneumokokken verursachen keine sichtbaren Löcher im *Monolayer* der Endothelzellen. Zudem verringert Aprotinin die Anzahl der in den Fluoreszenzmikroskopieproben detektierten zellfreien

Flächen und reduziert die Gesamtfläche der Löcher pro Fluoreszenzmikroskopieaufnahme in Proben der klinischen Isolate. Folglich wird die Ausbildung der zellfreien Flächen im HUVEC-*Monolayer* durch die Proteaseaktivität von Pneumokokken-gebundenem Plasmin induziert. Die durchschnittliche Fläche der einzelnen Löcher sowie die Gesamtfläche der Löcher pro Fluoreszenzmikroskopieaufnahme sind in den Proben von SP_{HUS}A- sowie Sp_{HUS}B-gebundenem und aktiviertem Plasmin im Durchschnitt größer als in Proben von D39- sowie D39 Δ pspC-gebundenem und aktiviertem Plasmin. Es wurde bereits beschrieben, dass die Menge von Pneumokokken-gebundenem Plasminogen mit der Umsetzung der synthetischen und natürlichen Plasmin-Substrate korreliert. Dies trifft ebenfalls auf die Schädigung der humanen, vaskulären Endothelzellen zu. Durch Rekrutierung größerer Mengen von Plasmin können die klinischen *S. pneumoniae*-Stämme die Proteaseaktivität von Plasmin, im Vergleich zum D39-Referenzstamm, effizienter nutzen.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass die beiden klinischen *S. pneumoniae*-Stämme Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B Plasminogen effizienter an ihre Oberfläche binden als der D39-Referenzstamm. PspC wurde in dieser Doktorarbeit als neuer Plasminogen-Ligand von *S. pneumoniae* identifiziert. Folglich könnte die effizientere Plasminogen-Rekrutierung der klinischen Isolate auf eine im Vergleich zu D39 verstärkte PspC-Oberflächenexpression zurückzuführen sein. Es muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass auch Variationen der Expression anderer Plasminogen-Liganden der Pneumokokken diese verstärkte Plasminogen-Bindung bedingen können. PspC- und Pneumokokken-gebundenes Plasminogen ist aktivierbar und PspC- sowie Pneumokokken-gebundenes Plasmin spaltet synthetische und natürliche Substrate. Des Weiteren schädigt Pneumokokken-gebundenes Plasmin humane, vaskuläre Endothelzellen und induziert die Exposition subendothelialer Bereiche. Sp_{HUS}A- und Sp_{HUS}B nutzen die Proteaseaktivität von Plasmin im Vergleich zum virulenten D39-Referenzstamm effizienter. Dies könnte ihnen die Kolonisierung des Wirtsgewebes sowie die Evasion der humanen Komplementattacke erleichtern. Zudem richten die klinischen Stämme mehr Schaden an humanen, vaskulären Endothelzellen an. Folglich wird deren Virulenz durch Plasminogen-Bindung erhöht (Abb. 23).

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit gestatten ein tiefgreifendes Verständnis der Komplementevasion zweier klinischer *S. pneumoniae*-Isolate sowie die Betrachtung der Pathogenese von pHUS aus einem bisher unbekannten, neuen Blickwinkel. Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B exprimieren große Mengen des multifunktionellen Virulenzfaktors PspC auf ihrer Oberfläche, wodurch ihnen eine effiziente Faktor H-Rekrutierung ermöglicht wird. Durch Ausnutzen der komplementinhibitorischen Funktion von Faktor H reduzieren die klinischen Isolate komplementvermittelte Opsonisierung sowie Phagozytose durch neutrophile Granulozyten und sichern damit ihr Überleben im menschlichen Organismus. Außerdem verstärkt die Bindung von Faktor H die Adhäsion von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B an humane,

vaskuläre Endothelzellen. Dies ist vor allem im Hinblick auf die Entstehung von pHUS von großer Bedeutung. Die klinischen *S. pneumoniae*-Stämme rekrutieren große Mengen Plasminogen an ihre Oberfläche. Dieses wird durch humane Plasminogenaktivatoren zu Plasmin konvertiert. Die Proteaseaktivität von Plasmin ermöglicht den klinischen Isolaten eine effektivere Kolonisierung humanen Gewebes und verbesserte Komplementevasion. Des Weiteren schädigt Plasmin auf der Oberfläche der klinischen Isolate humane, vaskuläre Endothelzellen und induziert die Freilegung der subendothelialen Matrix. Plasmin auf der Oberfläche von Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B schafft damit ein prothrombotisches Milieu. Dadurch könnten Thrombozyten aktiviert und intraluminale Thromben sowie luminale Obstruktionen gebildet werden. Dies induziert mechanische Hämolyse, führt zur Störung der Nierenfunktion und zur Ausprägung von HUS. In dieser Doktorarbeit wird damit erstmals eine Plasmin-vermittelte, Neuraminidase-unabhängige Pathogenese von pHUS vorgeschlagen.

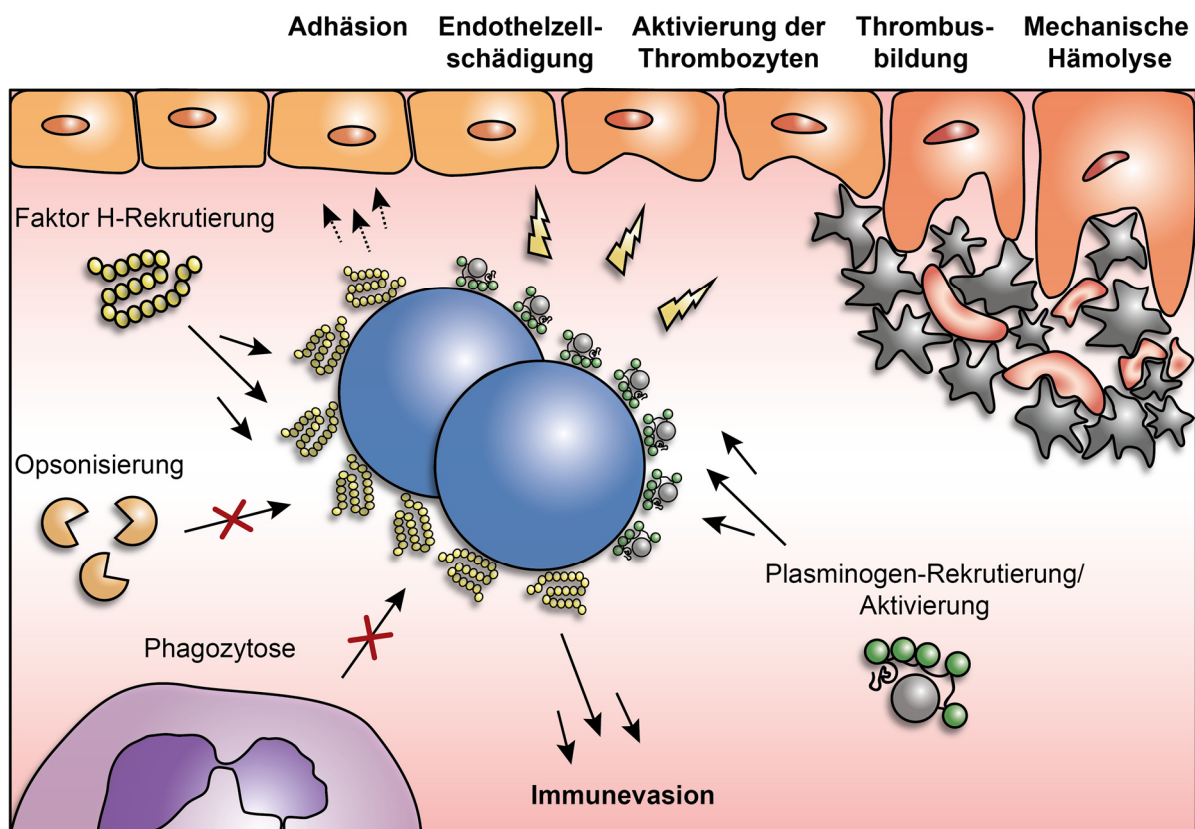


Abbildung 23: Immunevasion der klinischen *S. pneumoniae*-Isolate und Plasmin-vermittelte Induktion von pHUS

Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B rekrutieren große Mengen des Komplementregulators Faktor H an ihre Oberfläche. Die klinischen Isolate reduzieren dadurch komplementvermittelte Opsonisierung sowie Phagozytose durch neutrophile Granulozyten und sichern ihr Überleben im menschlichen Organismus. Die Bindung von Faktor H verstärkt zudem die Adhäsion der klinischen *S. pneumoniae*-Stämme an humane, vaskuläre Endothelzellen. Sp_{HUS}A und Sp_{HUS}B rekrutieren große Mengen Plasminogen an ihre Oberfläche. Aktiviertes Plasmin auf der Oberfläche der klinischen Isolate verbessert die Komplementevasion der Bakterien und schädigt humane, vaskuläre Endothelzellen. Dabei werden Bereiche der subendothelialen Matrix freigelegt, wodurch ein prothrombotisches Milieu entsteht, welches zur Aktivierung von Thrombozyten, Thrombusbildung, Gefäßobstruktion, mechanischen Hämolyse und damit zur Ausprägung von pHUS führt.

Literaturverzeichnis

1. MURPHY, K.P., et al., *Janeway's Immunobiology*. Vol. Bd. 978,Nr. 0-4129. 2008: Garland Science.
2. ROITT, I., BROSTOFF, J. , MALE, D. , *Immunology 6th Edition*. 2001: Harcourt Publishers Limited.
3. ABBAS, A.K., LICHTMAN, H.A., PILLAI, S. , *Cellular and molecular Immunology 6th edition*. 2007: Saunders Elsevier.
4. DELVES, P.J. AND I.M. ROITT, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. 343(1): p. 37-49.
5. DELVES, P.J. AND I.M. ROITT, *The immune system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. 343(2): p. 108-17.
6. MEDZHITOV, R. AND C. JANEWAY, JR., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. Immunol Rev, 2000. 173: p. 89-97.
7. MATZINGER, P., *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. 296(5566): p. 301-5.
8. ZIPFEL, P.F. AND C. SKERKA, *Complement regulators and inhibitory proteins*. Nat Rev Immunol, 2009. 9(10): p. 729-40.
9. MULLER-EBERHARD, H.J., *The killer molecule of complement*. J Invest Dermatol, 1985. 85(1 Suppl): p. 47s-52s.
10. NORDAHL, E.A., et al., *Activation of the complement system generates antibacterial peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(48): p. 16879-84.
11. CHATILA, T.A., *Molecular mechanisms of regulatory T-cell development*. Chem Immunol Allergy, 2008. 94: p. 16-28.
12. LEBIEN, T.W. AND T.F. TEDDER, *B lymphocytes: how they develop and function*. Blood, 2008. 112(5): p. 1570-80.
13. SCHMALSTIEG, F.C., JR. AND A.S. GOLDMAN, *Birth of the science of immunology*. J Med Biogr, 2010. 18(2): p. 88-98.
14. WALPORT, M.J., *Complement. First of two parts*. N Engl J Med, 2001. 344(14): p. 1058-66.
15. WALPORT, M.J., *Complement. Second of two parts*. N Engl J Med, 2001. 344(15): p. 1140-4.
16. OIKONOMOPOULOU, K., et al., *Interactions between coagulation and complement--their role in inflammation*. Semin Immunopathol, 2012. 34(1): p. 151-65.
17. HORSTMAN, L.L., et al., *Complement in neurobiology*. Front Biosci (Landmark Ed), 2011. 16: p. 2921-60.
18. ZIPFEL, P.F., R. WURZNER, AND C. SKERKA, *Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms*. Mol Immunol, 2007. 44(16): p. 3850-7.
19. ZIPFEL, P.F., T. HALLSTROM, AND K. RIESBECK, *Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes--tipping the balance*. Mol Immunol, 2013. 56(3): p. 152-60.
20. PANGBURN, M.K., R.D. SCHREIBER, AND H.J. MULLER-EBERHARD, *Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3*. J Exp Med, 1981. 154(3): p. 856-67.
21. MONTES, T., et al., *Functional basis of protection against age-related macular degeneration conferred by a common polymorphism in complement factor B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(11): p. 4366-71.
22. BRADLEY, D.T., P.F. ZIPFEL, AND A.E. HUGHES, *Complement in age-related macular degeneration: a focus on function*. Eye (Lond), 2011. 25(6): p. 683-93.
23. ZIPFEL, P.F., et al., *Complement and diseases: defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases*. Mol Immunol, 2006. 43(1-2): p. 97-106.

24. FEARON, D.T. AND K.F. AUSTEN, *Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase*. J Exp Med, 1975. 142(4): p. 856-63.
25. NESARGIKAR, P.N., B. SPILLER, AND R. CHAVEZ, *The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors*. Eur J Microbiol Immunol (Bp), 2012. 2(2): p. 103-11.
26. RICKLIN, D., et al., *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis*. Nat Immunol, 2010. 11(9): p. 785-97.
27. REID, K.B. AND R.R. PORTER, *Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement*. Biochem J, 1976. 155(1): p. 19-23.
28. NAVRATIL, J.S., et al., *The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells*. J Immunol, 2001. 166(5): p. 3231-9.
29. GABORIAUD, C., et al., *Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle*. Trends Immunol, 2004. 25(7): p. 368-73.
30. CHEN, C.B. AND R. WALLIS, *Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases*. J Biol Chem, 2004. 279(25): p. 26058-65.
31. THIEL, S., *Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins*. Mol Immunol, 2007. 44(16): p. 3875-88.
32. DOBO, J., et al., *MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity*. J Immunol, 2009. 183(2): p. 1207-14.
33. HARBOE, M. AND T.E. MOLLNES, *The alternative complement pathway revisited*. J Cell Mol Med, 2008. 12(4): p. 1074-84.
34. KILGORE, K.S., et al., *The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells*. Am J Pathol, 1996. 149(3): p. 953-61.
35. TEDESCO, F., et al., *The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity*. J Exp Med, 1997. 185(9): p. 1619-27.
36. SANCHEZ-CORRAL, P., et al., *Functional analysis in serum from atypical Hemolytic Uremic Syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H*. Mol Immunol, 2004. 41(1): p. 81-4.
37. EBERHARDT, H.U., et al., *Human factor H-related protein 2 (CFHR2) regulates complement activation*. PLoS One, 2013. 8(11): p. e78617.
38. HEBECKER, M. AND M. JOZSI, *Factor H-related protein 4 activates complement by serving as a platform for the assembly of alternative pathway C3 convertase via its interaction with C3b protein*. J Biol Chem, 2012. 287(23): p. 19528-36.
39. HEBECKER, M., et al., *Molecular basis of C-reactive protein binding and modulation of complement activation by factor H-related protein 4*. Mol Immunol, 2010. 47(6): p. 1347-55.
40. JOZSI, M. AND P.F. ZIPFEL, *Factor H family proteins and human diseases*. Trends Immunol, 2008. 29(8): p. 380-7.
41. CHEN, Q., et al., *Complement Factor H-Related 5-Hybrid Proteins Anchor Properdin and Activate Complement at Self-Surfaces*. J Am Soc Nephrol, 2016. 27(5): p. 1413-25.
42. MURPHY, B., et al., *Factor H-related protein-5: a novel component of human glomerular immune deposits*. Am J Kidney Dis, 2002. 39(1): p. 24-7.
43. BARTHEL, D., S. SCHINDLER, AND P.F. ZIPFEL, *Plasminogen is a complement inhibitor*. J Biol Chem, 2012. 287(22): p. 18831-42.
44. SEYA, T., et al., *Generation of C3d,g and C3d by urokinase-treated plasma in association with fibrinolysis*. Complement, 1985. 2(2-3): p. 165-74.
45. ZIPFEL, P.F., et al., *Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases*. Biochem Soc Trans, 2002. 30(Pt 6): p. 971-8.

46. NILSSON, U.R. AND H.J. MUELLER-EBERHARD, *Isolation of Beta If-Globulin from Human Serum and Its Characterization as the Fifth Component of Complement*. J Exp Med, 1965. 122: p. 277-98.
47. GIANNAKIS, E., et al., *Multiple ligand binding sites on domain seven of human complement factor H*. Int Immunopharmacol, 2001. 1(3): p. 433-43.
48. CLARK, S.J., et al., *Tissue-specific host recognition by complement factor H is mediated by differential activities of its glycosaminoglycan-binding regions*. J Immunol, 2013. 190(5): p. 2049-57.
49. HELLWAGE, J., et al., *Complement C3b/C3d and cell surface polyanions are recognized by overlapping binding sites on the most carboxyl-terminal domain of complement factor H*. J Immunol, 2002. 169(12): p. 6935-44.
50. SKERKA, C. AND P.F. ZIPFEL, *Complement factor H related proteins in immune diseases*. Vaccine, 2008. 26 Suppl 8: p. I9-14.
51. PANGBURN, M.K., R.D. SCHREIBER, AND H.J. MULLER-EBERHARD, *Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution*. J Exp Med, 1977. 146(1): p. 257-70.
52. WEILER, J.M., et al., *Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. 73(9): p. 3268-72.
53. WHALEY, K. AND S. RUDDY, *Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin*. J Exp Med, 1976. 144(5): p. 1147-63.
54. MORGAN, B.P., *The complement system: an overview*. Methods Mol Biol, 2000. 150: p. 1-13.
55. GORDON, D.L., et al., *Identification of complement regulatory domains in human factor H*. J Immunol, 1995. 155(1): p. 348-56.
56. JOKIRANTA, T.S., et al., *Analysis of the recognition mechanism of the alternative pathway of complement by monoclonal anti-factor H antibodies: evidence for multiple interactions between H and surface bound C3b*. FEBS Lett, 1996. 393(2-3): p. 297-302.
57. PRODINGER, W.M., et al., *The C-terminus of factor H: monoclonal antibodies inhibit heparin binding and identify epitopes common to factor H and factor H-related proteins*. Biochem J, 1998. 331 (Pt 1): p. 41-7.
58. SHARMA, A.K. AND M.K. PANGBURN, *Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(20): p. 10996-1001.
59. KUHN, S., C. SKERKA, AND P.F. ZIPFEL, *Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1*. J Immunol, 1995. 155(12): p. 5663-70.
60. BLACKMORE, T.K., et al., *Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H*. J Immunol, 1998. 160(7): p. 3342-8.
61. BLACKMORE, T.K., et al., *Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H*. J Immunol, 1996. 157(12): p. 5422-7.
62. PANGBURN, M.K., M.A. ATKINSON, AND S. MERI, *Localization of the heparin-binding site on complement factor H*. J Biol Chem, 1991. 266(25): p. 16847-53.
63. RAM, S., et al., *A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated Neisseria gonorrhoeae*. J Exp Med, 1998. 187(5): p. 743-52.
64. ALEXANDER, J.J., et al., *A protein with characteristics of factor H is present on rodent platelets and functions as the immune adherence receptor*. J Biol Chem, 2001. 276(34): p. 32129-35.
65. DISCIPIO, R.G., et al., *Human polymorphonuclear leukocytes adhere to complement factor H through an interaction that involves alphaMbeta2 (CD11b/CD18)*. J Immunol, 1998. 160(8): p. 4057-66.
66. MIYASHITA, C., E. WENZEL, AND M. HEIDEN, *Plasminogen: a brief introduction into its biochemistry and function*. Haemostasis, 1988. 18 Suppl 1: p. 7-13.

67. LAHTENMAKI, K., S. EDELMAN, AND T.K. KORHONEN, *Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion*. Trends Microbiol, 2005. 13(2): p. 79-85.
68. CESARMAN-MAUS, G. AND K.A. HAJJAR, *Molecular mechanisms of fibrinolysis*. Br J Haematol, 2005. 129(3): p. 307-21.
69. AGARWAL, V., et al., *A Novel Interaction between Complement Inhibitor C4b-binding Protein and Plasminogen That Enhances Plasminogen Activation*. J Biol Chem, 2015. 290(30): p. 18333-42.
70. LAHTENMAKI, K., P. KUUSELA, AND T.K. KORHONEN, *Plasminogen activation in degradation and penetration of extracellular matrices and basement membranes by invasive bacteria*. Methods, 2000. 21(2): p. 125-32.
71. MIGNATTI, P. AND D.B. RIFKIN, *Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion*. Physiol Rev, 1993. 73(1): p. 161-95.
72. MYOHANEN, H. AND A. VAHERI, *Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen*. Cell Mol Life Sci, 2004. 61(22): p. 2840-58.
73. AMARA, U., et al., *Interaction between the coagulation and complement system*. Adv Exp Med Biol, 2008. 632: p. 71-9.
74. PILLEMER, L., et al., *The inactivation of complement and its components by plasmin*. J Exp Med, 1953. 97(4): p. 573-89.
75. LAMBRIS, J.D., D. RICKLIN, AND B.V. GEISBRECHT, *Complement evasion by human pathogens*. Nat Rev Microbiol, 2008. 6(2): p. 132-42.
76. BLOM, A.M., T. HALLSTROM, AND K. RIESBECK, *Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond*. Mol Immunol, 2009. 46(14): p. 2808-17.
77. LEE, L.Y., et al., *Inhibition of complement activation by a secreted Staphylococcus aureus protein*. J Infect Dis, 2004. 190(3): p. 571-9.
78. HAMMEL, M., et al., *A structural basis for complement inhibition by Staphylococcus aureus*. Nat Immunol, 2007. 8(4): p. 430-7.
79. ROOIJAKKERS, S.H., et al., *Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases*. Nat Immunol, 2005. 6(9): p. 920-7.
80. PAUSA, M., et al., *Serum-resistant strains of Borrelia burgdorferi evade complement-mediated killing by expressing a CD59-like complement inhibitory molecule*. J Immunol, 2003. 170(6): p. 3214-22.
81. FRANK, M.M., *Annihilating host defense*. Nat Med, 2001. 7(12): p. 1285-6.
82. LUBINSKI, J., T. NAGASHUNMUGAM, AND H.M. FRIEDMAN, *Viral interference with antibody and complement*. Semin Cell Dev Biol, 1998. 9(3): p. 329-37.
83. KOSTAVASILIS, I., et al., *Mechanism of complement inactivation by glycoprotein C of herpes simplex virus*. J Immunol, 1997. 158(4): p. 1763-71.
84. FAVOREEL, H.W., et al., *Virus complement evasion strategies*. J Gen Virol, 2003. 84(Pt 1): p. 1-15.
85. PALMQVIST, N., et al., *Protein A is a virulence factor in Staphylococcus aureus arthritis and septic death*. Microb Pathog, 2002. 33(5): p. 239-49.
86. ITOH, S., et al., *Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) binds to human immunoglobulin G (IgG) and inhibits complement activation via the classical pathway*. Mol Immunol, 2010. 47(4): p. 932-8.
87. ROOIJAKKERS, S.H. AND J.A. VAN STRIJP, *Bacterial complement evasion*. Mol Immunol, 2007. 44(1-3): p. 23-32.
88. MCKENZIE, R., et al., *Regulation of complement activity by vaccinia virus complement-control protein*. J Infect Dis, 1992. 166(6): p. 1245-50.
89. ROSENGARD, A.M., et al., *Variola virus immune evasion design: expression of a highly efficient inhibitor of human complement*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(13): p. 8808-13.
90. INAL, J.M. AND R.B. SIM, *A Schistosoma protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of complement which binds human C2*. FEBS Lett, 2000. 470(2): p. 131-4.
91. DENG, J., et al., *Inhibition of the complement membrane attack complex by Schistosoma mansoni paramyosin*. Infect Immun, 2003. 71(11): p. 6402-10.

92. HONG, Y.Q. AND B. GHEBREHIWET, *Effect of Pseudomonas aeruginosa elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3*. Clin Immunol Immunopathol, 1992. 62(2): p. 133-8.
93. SCHENKEIN, H.A., et al., *Increased opsonization of a prtH-defective mutant of Porphyromonas gingivalis W83 is caused by reduced degradation of complement-derived opsonins*. J Immunol, 1995. 154(10): p. 5331-7.
94. TSAO, N., et al., *Streptococcal pyrogenic exotoxin B cleaves properdin and inhibits complement-mediated opsonophagocytosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. 339(3): p. 779-84.
95. CHMOURYGUINA, I., et al., *Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci*. Infect Immun, 1996. 64(7): p. 2387-90.
96. ODA, T., et al., *Inactivation of chemotactic activity of C5a by the serratial 56-kilodalton protease*. Infect Immun, 1990. 58(5): p. 1269-72.
97. GHENDLER, Y., et al., *Schistosoma mansoni: evidence for a 28-kDa membrane-anchored protease on schistosomula*. Exp Parasitol, 1996. 83(1): p. 73-82.
98. KRAICZY, P. AND R. WURZNER, *Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators*. Mol Immunol, 2006. 43(1-2): p. 31-44.
99. JARVA, H., et al., *Complement resistance mechanisms of streptococci*. Mol Immunol, 2003. 40(2-4): p. 95-107.
100. THERN, A., et al., *Ig-binding surface proteins of Streptococcus pyogenes also bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system*. J Immunol, 1995. 154(1): p. 375-86.
101. RAM, S., et al., *Binding of C4b-binding protein to porin: a molecular mechanism of serum resistance of Neisseria gonorrhoeae*. J Exp Med, 2001. 193(3): p. 281-95.
102. NORDSTROM, T., et al., *The emerging pathogen Moraxella catarrhalis interacts with complement inhibitor C4b binding protein through ubiquitous surface proteins A1 and A2*. J Immunol, 2004. 173(7): p. 4598-606.
103. WOOSTER, D.G., et al., *Logarithmic phase Escherichia coli K1 efficiently avoids serum killing by promoting C4bp-mediated C3b and C4b degradation*. Immunology, 2006. 117(4): p. 482-93.
104. DIEUDONNE-VATRAN, A., et al., *Clinical isolates of Streptococcus pneumoniae bind the complement inhibitor C4b-binding protein in a PspC allele-dependent fashion*. J Immunol, 2009. 182(12): p. 7865-77.
105. KIHLEBERG, B.M., et al., *Protein H, an antiphagocytic surface protein in Streptococcus pyogenes*. Infect Immun, 1999. 67(4): p. 1708-14.
106. RAM, S., et al., *The contrasting mechanisms of serum resistance of Neisseria gonorrhoeae and group B Neisseria meningitidis*. Mol Immunol, 1999. 36(13-14): p. 915-28.
107. JARVA, H., et al., *The group B streptococcal beta and pneumococcal Hic proteins are structurally related immune evasion molecules that bind the complement inhibitor factor H in an analogous fashion*. J Immunol, 2004. 172(5): p. 3111-8.
108. KIRJAVAINEN, V., et al., *Yersinia enterocolitica serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein*. PLoS Pathog, 2008. 4(8): p. e1000140.
109. ASAKAWA, R., et al., *Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Mol Microbiol, 2003. 50(4): p. 1125-39.
110. PANDIRIPALLY, V., et al., *Recruitment of complement factor H-like protein 1 promotes intracellular invasion by group A streptococci*. Infect Immun, 2003. 71(12): p. 7119-28.
111. KRAICZY, P., et al., *Immune evasion of Borrelia burgdorferi by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H*. Eur J Immunol, 2001. 31(6): p. 1674-84.
112. ZIPFEL, P.F., et al., *The complement fitness factor H: role in human diseases and for immune escape of pathogens, like pneumococci*. Vaccine, 2008. 26 Suppl 8: p. I67-74.

113. MOHAN, S., et al., *Tuf of Streptococcus pneumoniae is a surface displayed human complement regulator binding protein*. Mol Immunol, 2014. 62(1): p. 249-64.
114. LAHTENMAKI, K., P. KUUSELA, AND T.K. KORHONEN, *Bacterial plasminogen activators and receptors*. FEMS Microbiol Rev, 2001. 25(5): p. 531-52.
115. RAUTEMAA, R., et al., *Survival of Helicobacter pylori From complement lysis by binding of GPI-anchored protectin (CD59)*. Gastroenterology, 2001. 120(2): p. 470-9.
116. RAUTEMAA, R., et al., *Acquired resistance of Escherichia coli to complement lysis by binding of glycoposphoinositol-anchored protectin (CD59)*. Infect Immun, 1998. 66(5): p. 1928-33.
117. LUO, S., et al., *The pH-regulated antigen 1 of Candida albicans binds the human complement inhibitor C4b-binding protein and mediates fungal complement evasion*. J Biol Chem, 2011. 286(10): p. 8021-9.
118. LUO, S., et al., *Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus Candida albicans*. Mol Immunol, 2013. 56(3): p. 161-9.
119. LUO, S., et al., *Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 is a novel factor H-, factor H-like protein 1-, and plasminogen-binding surface protein of Candida albicans*. J Infect Dis, 2013. 207(4): p. 594-603.
120. LUO, S., et al., *Immune evasion of the human pathogenic yeast Candida albicans: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein*. Mol Immunol, 2009. 47(2-3): p. 541-50.
121. BEHNSEN, J., et al., *The opportunistic human pathogenic fungus Aspergillus fumigatus evades the host complement system*. Infect Immun, 2008. 76(2): p. 820-7.
122. PINTER, C., et al., *HIV glycoprotein 41 and complement factor H interact with each other and share functional as well as antigenic homology*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1995. 11(8): p. 971-80.
123. SCHMIDT, C.Q., A.T. KENNEDY, AND W.H. THAM, *More than just immune evasion: Hijacking complement by Plasmodium falciparum*. Mol Immunol, 2015. 67(1): p. 71-84.
124. SIMON, N., et al., *Malaria parasites co-opt human factor H to prevent complement-mediated lysis in the mosquito midgut*. Cell Host Microbe, 2013. 13(1): p. 29-41.
125. GOW, N.A., et al., *Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization*. Nat Rev Microbiol, 2012. 10(2): p. 112-22.
126. KOZEL, T.R., *Activation of the complement system by pathogenic fungi*. Clin Microbiol Rev, 1996. 9(1): p. 34-46.
127. PODACK, E.R., et al., *Membrane attach complex of complement (MAC): three-dimensional analysis of MAC-phospholipid vesicle recombinants*. The Journal of Immunology, 1982. 128(5): p. 2353-7.
128. JEDRZEJAS, M.J., *Pneumococcal virulence factors: structure and function*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. 65(2): p. 187-207 ; first page, table of contents.
129. HYAMS, C., et al., *The Streptococcus pneumoniae capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms*. Infect Immun, 2010. 78(2): p. 704-15.
130. CORBETT, D. AND I.S. ROBERTS, *The role of microbial polysaccharides in host-pathogen interaction*. F1000 Biol Rep, 2009. 1: p. 30.
131. JOINER, K., et al., *Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. III. C5b-9 deposits stably on rough and type 7 S. pneumoniae without causing bacterial killing*. J Immunol, 1983. 130(2): p. 845-9.
132. SILHAVY, T.J., D. KAHNE, AND S. WALKER, *The bacterial cell envelope*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. 2(5): p. a000414.
133. NEUHAUS, F.C. AND J. BADDILEY, *A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. 67(4): p. 686-723.
134. SCOTT, J.R. AND T.C. BARNETT, *Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there*. Annu Rev Microbiol, 2006. 60: p. 397-423.
135. CARTWRIGHT, K., *Pneumococcal disease in western Europe: burden of disease, antibiotic resistance and management*. Eur J Pediatr, 2002. 161(4): p. 188-95.

136. AUSTRIAN, R., et al., *Simultaneous production of two capsular polysaccharides by pneumococcus. II. The genetic and biochemical bases of binary capsulation*. J Exp Med, 1959. 110: p. 585-602.
137. MAVROIDI, A., et al., *Evolutionary genetics of the capsular locus of serogroup 6 pneumococci*. J Bacteriol, 2004. 186(24): p. 8181-92.
138. PATON, J.C., J.K. MORONA, AND R. MORONA, *Characterization of the capsular polysaccharide biosynthesis locus of Streptococcus pneumoniae type 19F*. Microb Drug Resist, 1997. 3(1): p. 89-99.
139. RODRIGO, C. AND W.S. LIM, *The relevance of pneumococcal serotypes*. Curr Infect Dis Rep, 2014. 16(4): p. 403.
140. REVAI, K., et al., *Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal bacterial colonization during acute otitis media*. Pediatrics, 2006. 117(5): p. 1823-9.
141. O'BRIEN, K.L., et al., *Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates*. Lancet, 2009. 374(9693): p. 893-902.
142. NOVAK, R.W., C.R. MARTIN, AND E.N. ORSINI, *Hemolytic-uremic syndrome and T-cryptantigen exposure by neuraminidase-producing pneumococci: an emerging problem?* Pediatr Pathol, 1983. 1(4): p. 409-13.
143. BLASI, F., et al., *Understanding the burden of pneumococcal disease in adults*. Clin Microbiol Infect, 2012. 18 Suppl 5: p. 7-14.
144. MAESTRO, B. AND J.M. SANZ, *Choline Binding Proteins from Streptococcus pneumoniae: A Dual Role as Enzybiotics and Targets for the Design of New Antimicrobials*. Antibiotics (Basel), 2016. 5(2).
145. ROSE, M. AND S. ZIELEN, *Impact of infant immunization programs with pneumococcal conjugate vaccine in Europe*. Expert Rev Vaccines, 2009. 8(10): p. 1351-64.
146. WHITNEY, C.G., et al., *Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine*. N Engl J Med, 2003. 348(18): p. 1737-46.
147. CENTERS FOR DISEASE, C. AND PREVENTION, *Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine for adults with immunocompromising conditions: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2012. 61(40): p. 816-9.
148. PARADISO, P.R., *Advances in pneumococcal disease prevention: 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for infants and children*. Clin Infect Dis, 2011. 52(10): p. 1241-7.
149. FELDMAN, C. AND R. ANDERSON, *Recent advances in our understanding of Streptococcus pneumoniae infection*. F1000Prime Rep, 2014. 6: p. 82.
150. ALEXANDRE, C., et al., *Rebound in the incidence of pneumococcal meningitis in northern France: effect of serotype replacement*. Acta Paediatr, 2010. 99(11): p. 1686-90.
151. WEIL-OLIVIER, C., et al., *Prevention of pneumococcal diseases in the post-seven valent vaccine era: a European perspective*. BMC Infect Dis, 2012. 12: p. 207.
152. CABALLERO, J. AND J. RELLO, *Combination antibiotic therapy for community-acquired pneumonia*. Ann Intensive Care, 2011. 1: p. 48.
153. NIEDERMAN, M.S. AND C.M. LUNA, *Community-acquired pneumonia guidelines: a global perspective*. Semin Respir Crit Care Med, 2012. 33(3): p. 298-310.
154. TODOROVA, K., et al., *Transfer of penicillin resistance from Streptococcus oralis to Streptococcus pneumoniae identifies murE as resistance determinant*. Mol Microbiol, 2015. 97(5): p. 866-80.
155. ALBRICH, W.C., D.L. MONNET, AND S. HARBARTH, *Antibiotic selection pressure and resistance in Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes*. Emerg Infect Dis, 2004. 10(3): p. 514-7.
156. FELMINGHAM, D., R. CANTON, AND S.G. JENKINS, *Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among Streptococcus pneumoniae isolates 2001-2004*. J Infect, 2007. 55(2): p. 111-8.

157. SORENSEN, U.B., et al., *Covalent linkage between the capsular polysaccharide and the cell wall peptidoglycan of Streptococcus pneumoniae revealed by immunochemical methods*. Microb Pathog, 1990. 8(5): p. 325-34.
158. NIETO, P.A., et al., *Gene elements that regulate Streptococcus pneumoniae virulence and immunity evasion*. Curr Gene Ther, 2013. 13(1): p. 51-64.
159. BERGMANN, S. AND S. HAMMERSCHMIDT, *Versatility of pneumococcal surface proteins*. Microbiology, 2006. 152(Pt 2): p. 295-303.
160. MARTNER, A., et al., *Pneumolysin released during Streptococcus pneumoniae autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils*. Infect Immun, 2008. 76(9): p. 4079-87.
161. MARTNER, A., et al., *Streptococcus pneumoniae autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines*. Infect Immun, 2009. 77(9): p. 3826-37.
162. GOSINK, K.K., et al., *Role of novel choline binding proteins in virulence of Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 2000. 68(10): p. 5690-5.
163. JOHNSBORG, O., et al., *A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in Streptococcus pneumoniae and related commensal species*. Mol Microbiol, 2008. 69(1): p. 245-53.
164. BRUEGGEMANN, A.B., et al., *Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States*. PLoS Pathog, 2007. 3(11): p. e168.
165. CLAVERYS, J.P. AND L.S. HAVARSTEIN, *Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'etre*. Nat Rev Microbiol, 2007. 5(3): p. 219-29.
166. KIETZMAN, C.C., et al., *Dynamic capsule restructuring by the main pneumococcal autolysin LytA in response to the epithelium*. Nat Commun, 2016. 7: p. 10859.
167. MOSCOSO, M., E. GARCIA, AND R. LOPEZ, *Biofilm formation by Streptococcus pneumoniae: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion*. J Bacteriol, 2006. 188(22): p. 7785-95.
168. RAMOS-SEVILLANO, E., et al., *Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of Streptococcus pneumoniae*. PLoS One, 2011. 6(8): p. e23626.
169. HOLTJE, J.V. AND A. TOMASZ, *Teichoic acid phosphorylcholine esterase. A novel enzyme activity in pneumococcus*. J Biol Chem, 1974. 249(21): p. 7032-4.
170. DE LAS RIVAS, B., et al., *Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase*. Microb Drug Resist, 2001. 7(3): p. 213-22.
171. HERMOSO, J.A., et al., *Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce*. Nat Struct Mol Biol, 2005. 12(6): p. 533-8.
172. KHARAT, A.S. AND A. TOMASZ, *Drastic reduction in the virulence of Streptococcus pneumoniae expressing type 2 capsular polysaccharide but lacking choline residues in the cell wall*. Mol Microbiol, 2006. 60(1): p. 93-107.
173. ATTALI, C., et al., *Streptococcus pneumoniae choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix*. Infect Immun, 2008. 76(2): p. 466-76.
174. GUIRAL, S., et al., *Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen Streptococcus pneumoniae: genetic requirements*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(24): p. 8710-5.
175. MOLINA, R., et al., *Crystal structure of CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from Streptococcus pneumoniae*. EMBO Rep, 2009. 10(3): p. 246-51.
176. TU, A.H., et al., *Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 1999. 67(9): p. 4720-4.
177. HAMMERSCHMIDT, S., et al., *Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 1999. 67(4): p. 1683-7.
178. SHAPER, M., et al., *PspA protects Streptococcus pneumoniae from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]*. Infect Immun, 2004. 72(9): p. 5031-40.

179. KRIVAN, H.C., D.D. ROBERTS, AND V. GINSBURG, *Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(16): p. 6157-61.
180. SHAKHNOVICH, E.A., S.J. KING, AND J.N. WEISER, *Neuraminidase expressed by Streptococcus pneumoniae desialylates the lipopolysaccharide of Neisseria meningitidis and Haemophilus influenzae: a paradigm for interbacterial competition among pathogens of the human respiratory tract*. Infect Immun, 2002. 70(12): p. 7161-4.
181. BERRY, A.M., et al., *Cloning and nucleotide sequence of the Streptococcus pneumoniae hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant Escherichia coli*. Infect Immun, 1994. 62(3): p. 1101-8.
182. ANDERTON, J.M., et al., *E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of Streptococcus pneumoniae*. Microb Pathog, 2007. 42(5-6): p. 225-36.
183. MARRA, A., et al., *In vivo characterization of the psa genes from Streptococcus pneumoniae in multiple models of infection*. Microbiology, 2002. 148(Pt 5): p. 1483-91.
184. HOLMES, A.R., et al., *The pavA gene of Streptococcus pneumoniae encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence*. Mol Microbiol, 2001. 41(6): p. 1395-408.
185. PRACHT, D., et al., *PavA of Streptococcus pneumoniae modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation*. Infect Immun, 2005. 73(5): p. 2680-9.
186. BERGMANN, S., M. ROHDE, AND S. HAMMERSCHMIDT, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Streptococcus pneumoniae is a surface-displayed plasminogen-binding protein*. Infect Immun, 2004. 72(4): p. 2416-9.
187. BERGMANN, S., et al., *The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration*. Thromb Haemost, 2005. 94(2): p. 304-11.
188. ATTALI, C., et al., *The interaction of Streptococcus pneumoniae with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage*. Infect Immun, 2008. 76(11): p. 5350-6.
189. RAYNER, C.F., et al., *Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of Streptococcus pneumoniae with human respiratory mucosa*. Infect Immun, 1995. 63(2): p. 442-7.
190. STEINFORT, C., et al., *Effect of Streptococcus pneumoniae on human respiratory epithelium in vitro*. Infect Immun, 1989. 57(7): p. 2006-13.
191. RUBINS, J.B. AND E.N. JANOFF, *Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor*. J Lab Clin Med, 1998. 131(1): p. 21-7.
192. EHRENBERG, M., et al., *How many EF-Tu molecules participate in aminoacyl-tRNA binding and peptide bond formation in Escherichia coli translation?* J Mol Biol, 1990. 211(4): p. 739-49.
193. SPRINZL, M., *Elongation factor Tu: a regulatory GTPase with an integrated effector*. Trends Biochem Sci, 1994. 19(6): p. 245-50.
194. ZHANG, Y.X., et al., *Cloning, sequencing, and expression in Escherichia coli of the gene encoding a 45-kilodalton protein, elongation factor Tu, from Chlamydia trachomatis serovar F*. J Bacteriol, 1994. 176(4): p. 1184-7.
195. MUKHOPADHYAY, S., et al., *Complex formation of the elongation factor Tu from Pseudomonas aeruginosa with nucleoside diphosphate kinase modulates ribosomal GTP synthesis and peptide chain elongation*. J Biol Chem, 1997. 272(28): p. 17815-20.
196. MURASE, K., et al., *EF-Tu binding peptides identified, dissected, and affinity optimized by phage display*. Chem Biol, 2003. 10(2): p. 161-8.
197. CALDAS, T.D., A. EL YAAGOUBI, AND G. RICHARME, *Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu*. J Biol Chem, 1998. 273(19): p. 11478-82.

198. KUNERT, A., et al., *Immune evasion of the human pathogen Pseudomonas aeruginosa: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein*. J Immunol, 2007. 179(5): p. 2979-88.
199. YOUNG, C.C. AND R.W. BERNLOHR, *Elongation factor Tu is methylated in response to nutrient deprivation in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1991. 173(10): p. 3096-100.
200. MARQUES, M.A., et al., *Mapping and identification of the major cell wall-associated components of Mycobacterium leprae*. Infect Immun, 1998. 66(6): p. 2625-31.
201. DALLO, S.F., et al., *Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in Mycoplasma pneumoniae*. Mol Microbiol, 2002. 46(4): p. 1041-51.
202. NIEVES, W., et al., *Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during Burkholderia infection and immunization*. PLoS One, 2010. 5(12): p. e14361.
203. GRANATO, D., et al., *Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of Lactobacillus johnsonii NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins*. Infect Immun, 2004. 72(4): p. 2160-9.
204. BALASUBRAMANIAN, S., T.R. KANNAN, AND J.B. BASEMAN, *The surface-exposed carboxyl region of Mycoplasma pneumoniae elongation factor Tu interacts with fibronectin*. Infect Immun, 2008. 76(7): p. 3116-23.
205. WANG, G., et al., *The Roles of Moonlighting Proteins in Bacteria*. Curr Issues Mol Biol, 2014. 16: p. 15-22.
206. YANG, C.K., et al., *Nonclassical protein secretion by Bacillus subtilis in the stationary phase is not due to cell lysis*. J Bacteriol, 2011. 193(20): p. 5607-15.
207. CHHATWAL, G.S., *Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors*. Trends Microbiol, 2002. 10(5): p. 205-8.
208. ROSENOW, C., et al., *Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol, 1997. 25(5): p. 819-29.
209. CHENG, Q., D. FINKEL, AND M.K. HOSTETTER, *Novel purification scheme and functions for a C3-binding protein from Streptococcus pneumoniae*. Biochemistry, 2000. 39(18): p. 5450-7.
210. HAMMERSCHMIDT, S., et al., *SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component*. Mol Microbiol, 1997. 25(6): p. 1113-24.
211. JARVA, H., et al., *Streptococcus pneumoniae evades complement attack and opsonophagocytosis by expressing the pspC locus-encoded Hic protein that binds to short consensus repeats 8-11 of factor H*. J Immunol, 2002. 168(4): p. 1886-94.
212. BROOKS-WALTER, A., D.E. BRILES, AND S.K. HOLLINGSHEAD, *The pspC gene of Streptococcus pneumoniae encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia*. Infect Immun, 1999. 67(12): p. 6533-42.
213. IANNELLI, F., M.R. OGGIONI, AND G. POZZI, *Allelic variation in the highly polymorphic locus pspC of Streptococcus pneumoniae*. Gene, 2002. 284(1-2): p. 63-71.
214. NAVARRE, W.W. AND O. SCHNEEWIND, *Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. 63(1): p. 174-229.
215. BALACHANDRAN, P., et al., *Role of pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 2002. 70(5): p. 2526-34.
216. HAMMERSCHMIDT, S., et al., *Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of Streptococcus pneumoniae via a hexapeptide motif*. Mol Microbiol, 2000. 36(3): p. 726-36.
217. ZHANG, J.R., et al., *The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells*. Cell, 2000. 102(6): p. 827-37.
218. BROCK, S.C., et al., *The human polymeric immunoglobulin receptor facilitates invasion of epithelial cells by Streptococcus pneumoniae in a strain-specific and cell type-specific manner*. Infect Immun, 2002. 70(9): p. 5091-5.

219. IANNELLI, F., et al., *Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by Streptococcus pneumoniae in mice*. Infect Immun, 2004. 72(5): p. 3077-80.
220. ORIHUELA, C.J., et al., *Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models*. J Clin Invest, 2009. 119(6): p. 1638-46.
221. WOOF, J.M. AND J. MESTECKY, *Mucosal immunoglobulins*. Immunol Rev, 2005. 206: p. 64-82.
222. DAVE, S., et al., *PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H*. Infect Immun, 2001. 69(5): p. 3435-7.
223. JANULCZYK, R., et al., *Hic, a novel surface protein of Streptococcus pneumoniae that interferes with complement function*. J Biol Chem, 2000. 275(47): p. 37257-63.
224. HAMMERSCHMIDT, S., et al., *The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of Streptococcus pneumoniae and mediates adhesion to host epithelial cells*. J Immunol, 2007. 178(9): p. 5848-58.
225. LU, L., Y. MA, AND J.R. ZHANG, *Streptococcus pneumoniae recruits complement factor H through the amino terminus of CbpA*. J Biol Chem, 2006. 281(22): p. 15464-74.
226. AGARWAL, V., et al., *Complement regulator Factor H mediates a two-step uptake of Streptococcus pneumoniae by human cells*. J Biol Chem, 2010. 285(30): p. 23486-95.
227. VOSS, S., et al., *The Choline-binding Protein PspC of Streptococcus pneumoniae Interacts with the C-terminal Heparin-binding Domain of Vitronectin*. J Biol Chem, 2013. 288(22): p. 15614-27.
228. ANGEL, C.S., M. RUZEK, AND M.K. HOSTETTER, *Degradation of C3 by Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis, 1994. 170(3): p. 600-8.
229. KAPLAN, B.S. AND K.N. DRUMMOND, *The hemolytic-uremic syndrome is a syndrome*. N Engl J Med, 1978. 298(17): p. 964-6.
230. OBEIDAT, M., M. OBEIDAT, AND B.J. BALLERMANN, *Glomerular endothelium: a porous sieve and formidable barrier*. Exp Cell Res, 2012. 318(9): p. 964-72.
231. GILBERT, R.D., A. NAGRA, AND M.R. HAQ, *Does dysregulated complement activation contribute to haemolytic uraemic syndrome secondary to Streptococcus pneumoniae?* Med Hypotheses, 2013. 81(3): p. 400-3.
232. SKERKA, C., et al., *Autoantibodies in haemolytic uraemic syndrome (HUS)*. Thromb Haemost, 2009. 101(2): p. 227-32.
233. SPINALE, J.M., et al., *Update on Streptococcus pneumoniae associated hemolytic uremic syndrome*. Curr Opin Pediatr, 2013. 25(2): p. 203-8.
234. LOIRAT, C. AND V. FREMEAUX-BACCHI, *Atypical hemolytic uremic syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2011. 6: p. 60.
235. ZIPFEL, P.F., et al., *Novel developments in thrombotic microangiopathies: is there a common link between hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura?* Pediatr Nephrol, 2011. 26(11): p. 1947-56.
236. BITZAN, M., *Treatment options for HUS secondary to Escherichia coli O157:H7*. Kidney Int Suppl, 2009(112): p. S62-6.
237. SERNA, A.T. AND E.C. BOEDEKER, *Pathogenesis and treatment of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections*. Curr Opin Gastroenterol, 2008. 24(1): p. 38-47.
238. SCHEIRING, J., S.P. ANDREOLI, AND L.B. ZIMMERHACKL, *Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS)*. Pediatr Nephrol, 2008. 23(10): p. 1749-60.
239. SCALLAN, E., et al., *Estimates of illnesses, hospitalizations and deaths caused by major bacterial enteric pathogens in young children in the United States*. Pediatr Infect Dis J, 2013. 32(3): p. 217-21.
240. FRASER, M.E., et al., *Crystal structure of the holotoxin from Shigella dysenteriae at 2.5 Å resolution*. Nat Struct Biol, 1994. 1(1): p. 59-64.
241. CIMOLAI, N., et al., *Risk factors for the progression of Escherichia coli O157:H7 enteritis to hemolytic-uremic syndrome*. J Pediatr, 1990. 116(4): p. 589-92.
242. KEIR, L.S., *Shiga toxin associated hemolytic uremic syndrome*. Hematol Oncol Clin North Am, 2015. 29(3): p. 525-39.

243. TE LOO, D.M., et al., *Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome*. Blood, 2000. 95(11): p. 3396-402.
244. OBRIG, T.G., T.P. MORAN, AND J.E. BROWN, *The mode of action of Shiga toxin on peptide elongation of eukaryotic protein synthesis*. Biochem J, 1987. 244(2): p. 287-94.
245. PIJPERS, A.H., et al., *Verocytotoxin-induced apoptosis of human microvascular endothelial cells*. J Am Soc Nephrol, 2001. 12(4): p. 767-78.
246. BRIGOTTI, M., et al., *Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells*. FASEB J, 2002. 16(3): p. 365-72.
247. ERWERT, R.D., et al., *Shiga toxin induces decreased expression of the anti-apoptotic protein Mcl-1 concomitant with the onset of endothelial apoptosis*. Microb Pathog, 2003. 35(2): p. 87-93.
248. MORIGI, M., et al., *Alternative pathway activation of complement by Shiga toxin promotes exuberant C3a formation that triggers microvascular thrombosis*. J Immunol, 2011. 187(1): p. 172-80.
249. ORTH, D., et al., *Shiga toxin activates complement and binds factor H: evidence for an active role of complement in hemolytic uremic syndrome*. J Immunol, 2009. 182(10): p. 6394-400.
250. POOLPOL, K., et al., *Interaction of Shiga toxin 2 with complement regulators of the factor H protein family*. Mol Immunol, 2014. 58(1): p. 77-84.
251. WONG, C.S., et al., *The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of Escherichia coli O157:H7 infections*. N Engl J Med, 2000. 342(26): p. 1930-6.
252. NORIS, M. AND G. REMUZZI, *Hemolytic uremic syndrome*. J Am Soc Nephrol, 2005. 16(4): p. 1035-50.
253. GARG, A.X., et al., *Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression*. JAMA, 2003. 290(10): p. 1360-70.
254. CALETTI, M.G., et al., *Two different therapeutic regimes in patients with sequelae of hemolytic-uremic syndrome*. Pediatr Nephrol, 2004. 19(10): p. 1148-52.
255. PAPE, L., et al., *Eculizumab in Typical Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) With Neurological Involvement*. Medicine (Baltimore), 2015. 94(24): p. e1000.
256. LOIRAT, C. AND P. NIAUDET, *The risk of recurrence of hemolytic uremic syndrome after renal transplantation in children*. Pediatr Nephrol, 2003. 18(11): p. 1095-101.
257. FAKHOURI, F. AND V. FREMEAUX-BACCHI, *Does hemolytic uremic syndrome differ from thrombotic thrombocytopenic purpura?* Nat Clin Pract Nephrol, 2007. 3(12): p. 679-87.
258. ATKINSON, J.P., et al., *Hemolytic uremic syndrome: an example of insufficient complement regulation on self-tissue*. Ann N Y Acad Sci, 2005. 1056: p. 144-52.
259. ZIPFEL, P.F., et al., *The role of defective complement control in hemolytic uremic syndrome*. Semin Thromb Hemost, 2006. 32(2): p. 146-54.
260. PEREZ-CABALLERO, D., et al., *Clustering of missense mutations in the C-terminal region of factor H in atypical hemolytic uremic syndrome*. Am J Hum Genet, 2001. 68(2): p. 478-84.
261. WARWICKER, P., et al., *Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome*. Kidney Int, 1998. 53(4): p. 836-44.
262. RICHARDS, A., et al., *Mutations in human complement regulator, membrane cofactor protein (CD46), predispose to development of familial hemolytic uremic syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(22): p. 12966-71.
263. FREMEAUX-BACCHI, V., et al., *Complement factor I: a susceptibility gene for atypical haemolytic uraemic syndrome*. J Med Genet, 2004. 41(6): p. e84.
264. SELLIER-LECLERC, A.L., et al., *Differential impact of complement mutations on clinical characteristics in atypical hemolytic uremic syndrome*. J Am Soc Nephrol, 2007. 18(8): p. 2392-400.

265. NORIS, M., et al., *Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype*. Clin J Am Soc Nephrol, 2010. 5(10): p. 1844-59.
266. CAPRIOLI, J., et al., *Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome*. Blood, 2006. 108(4): p. 1267-79.
267. GRUPPO, R.A. AND R.P. ROTHER, *Eculizumab for congenital atypical hemolytic-uremic syndrome*. N Engl J Med, 2009. 360(5): p. 544-6.
268. ARTZ, M.A., et al., *Renal transplantation in patients with hemolytic uremic syndrome: high rate of recurrence and increased incidence of acute rejections*. Transplantation, 2003. 76(5): p. 821-6.
269. KOZIOLEK, M.J., et al., *Chronic course of a hemolytic uremic syndrome caused by a deficiency of factor H-related proteins (CFHR1 and CFHR3)*. Kidney Int, 2008. 74(3): p. 384-8.
270. ZIPFEL, P.F., et al., *Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome*. PLoS Genet, 2007. 3(3): p. e41.
271. JOZSI, M., et al., *Anti factor H autoantibodies block C-terminal recognition function of factor H in hemolytic uremic syndrome*. Blood, 2007. 110(5): p. 1516-8.
272. JOZSI, M., et al., *Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency*. Blood, 2008. 111(3): p. 1512-4.
273. SAUNDERS, R.E., et al., *The interactive Factor H-atypical hemolytic uremic syndrome mutation database and website: update and integration of membrane cofactor protein and Factor I mutations with structural models*. Hum Mutat, 2007. 28(3): p. 222-34.
274. ZIPFEL, P.F., et al., *DEAP-HUS: deficiency of CFHR plasma proteins and autoantibody-positive form of hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Nephrol, 2010. 25(10): p. 2009-19.
275. KAPLAN, S.L., et al., *Three-year multicenter surveillance of systemic pneumococcal infections in children*. Pediatrics, 1998. 102(3 Pt 1): p. 538-45.
276. COPELOVITCH, L. AND B.S. KAPLAN, *Streptococcus pneumoniae-associated hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Nephrol, 2008. 23(11): p. 1951-6.
277. CONSTANTINESCU, A.R., et al., *Non-enteropathic hemolytic uremic syndrome: causes and short-term course*. Am J Kidney Dis, 2004. 43(6): p. 976-82.
278. WATERS, A.M., et al., *Hemolytic uremic syndrome associated with invasive pneumococcal disease: the United kingdom experience*. J Pediatr, 2007. 151(2): p. 140-4.
279. BANERJEE, R., et al., *Streptococcus pneumoniae-associated hemolytic uremic syndrome among children in North America*. Pediatr Infect Dis J, 2011. 30(9): p. 736-9.
280. LEE, C.S., et al., *Invasive pneumococcal pneumonia is the major cause of paediatric haemolytic-uraemic syndrome in Taiwan*. Nephrology (Carlton), 2012. 17(1): p. 48-52.
281. KLEIN, P.J., et al., *Thomsen-Friedenreich antigen in haemolytic-uraemic syndrome*. Lancet, 1977. 2(8046): p. 1024-5.
282. TOBE, T.J., et al., *Hemolytic uremic syndrome due to Capnocytophaga canimorsus bacteremia after a dog bite*. Am J Kidney Dis, 1999. 33(6): p. e5.
283. CALTIK, A., et al., *Hemolytic uremic syndrome triggered with a new pandemic virus: influenza A (H1N1)*. Pediatr Nephrol, 2011. 26(1): p. 147-8.
284. GEARY, D.F., *Hemolytic uremic syndrome and streptococcus pneumoniae: improving our understanding*. J Pediatr, 2007. 151(2): p. 113-4.
285. EDER, A.F. AND C.S. MANNO, *Does red-cell T activation matter?* Br J Haematol, 2001. 114(1): p. 25-30.
286. PRESTIDGE, C. AND W. WONG, *Ten years of pneumococcal-associated haemolytic uraemic syndrome in New Zealand children*. J Paediatr Child Health, 2009. 45(12): p. 731-5.
287. AULT, B.H., *Factor H and the pathogenesis of renal diseases*. Pediatr Nephrol, 2000. 14(10-11): p. 1045-53.

288. VON VIGIER, R.O., K. SEIBEL, AND M.G. BIANCHETTI, *Positive Coombs test in pneumococcus-associated hemolytic uremic syndrome. A review of the literature.* Nephron, 1999. 82(2): p. 183-4.
289. NOVOGRODSKY, A., et al., *Peanut agglutinin, a new mitogen that binds to galactosyl sites exposed after neuraminidase treatment.* J Immunol, 1975. 115(5): p. 1243-8.
290. ALON, U., S.P. ADLER, AND J.C. CHAN, *Hemolytic-uremic syndrome associated with Streptococcus pneumoniae. Report of a case and review of the literature.* Am J Dis Child, 1984. 138(5): p. 496-9.
291. *Therapy for children with invasive pneumococcal infections.* American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. Pediatrics, 1997. 99(2): p. 289-99.
292. KRYSAN, D.J. AND J.T. FLYNN, *Renal transplantation after Streptococcus pneumoniae-associated hemolytic uremic syndrome.* Am J Kidney Dis, 2001. 37(2): p. E15.
293. MEINEL, C., *Characterization of the immune evasion proteins PspC and Tuf of two clinical Streptococcus pneumoniae isolates.* Master Thesis, 2013.
294. REZA, M.J., et al., *Dissection of functional sites in herpesvirus saimiri complement control protein homolog.* J Virol, 2013. 87(1): p. 282-95.
295. DASARI, P., et al., *Digestive vacuoles of Plasmodium falciparum are selectively phagocytosed by and impair killing function of polymorphonuclear leukocytes.* Blood, 2011. 118(18): p. 4946-56.
296. MORENO, A.T., et al., *Cross-reactivity of antipneumococcal surface protein C (PspC) antibodies with different strains and evaluation of inhibition of human complement factor H and secretory IgA binding via PspC.* Clin Vaccine Immunol, 2012. 19(4): p. 499-507.
297. DAVE, S., et al., *Dual roles of PspC, a surface protein of Streptococcus pneumoniae, in binding human secretory IgA and factor H.* J Immunol, 2004. 173(1): p. 471-7.
298. AGARWAL, V., et al., *Streptococcus pneumoniae endopeptidase O (PepO) is a multifunctional plasminogen- and fibronectin-binding protein, facilitating evasion of innate immunity and invasion of host cells.* J Biol Chem, 2013. 288(10): p. 6849-63.
299. FULDE, M., et al., *Pneumococcal phosphoglycerate kinase interacts with plasminogen and its tissue activator.* Thromb Haemost, 2014. 111(3): p. 401-16.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Die vorliegende Dissertation wurde von mir selbst angefertigt. Alle verwendeten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen sind in der Arbeit vermerkt. Alle Personen die mich bei der Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskriptes unterstützt haben, sind von mir benannt.

Ich habe keinen Promotionsberater in Anspruch genommen. Zudem erhielten keine Dritten unmittelbare oder mittelbar geldwerte Leistungen von mir, welche im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Die vorliegende Dissertation wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Von mir wurde keine identische oder abgeänderte Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 25.10.2016

Christian Meinel

Lebenslauf



PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum: 15.06.1989
 Geburtsort: Gera
 Familienstand: verheiratet
 Anschrift: Fuchsklamm 2, 07548 Gera
 Telefon: 0365/51 33 44 55
 Mobil: 0157/77 81 34 02
 E-Mail: christian.meinel89@gmail.com

BILDUNGSWEG

seit 10/2013

Promotion

Friedrich-Schiller-Universität Jena
 Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V.
 – Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena
 Projekt: „Immune evasion of the Gram-positive bacterium
Streptococcus pneumoniae“
 Förderung: Jena School for Microbial Communication (JSMC)

10/2011 – 11/2013

Masterstudium

Friedrich-Schiller-Universität Jena
 M.Sc. *Molecular Medicine*
 Abschluss: *Master of Science* (1,1)
 Masterarbeit (Abschlussnote: 1,1):
 „Characterization of the immune evasion proteins PspC and Tuf of
 two clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates“
 Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V.
 – Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena

10/2008 – 09/2011

Bachelorstudium

Friedrich-Schiller-Universität Jena
 B.Sc. Biochemie/Molekularbiologie
 Abschluss: *Bachelor of Science* (1,6)
 Bachelorarbeit (Abschlussnote: 1,1):
 „Funktionelle Charakterisierung von Faktor H-Autoantikörpern bei
 DEAP HUS-Patienten“
 Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V.
 – Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena

10/2007 – 06/2008

Wehrdienst

Panzerlehrbrigade 9, Munster

09/1999 – 06/2007

Hochschulreife

Zabel-Gymnasium, Gera
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (1,9)

Jena, den 25.10.2016

Christian Meinel

Vorträge, Poster, Auszeichnungen und Publikationen

Vorträge

- 03/2016 Jahrestagung 2016 der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte
Mikrobiologie (VAAM) (Jena, Deutschland)
„*Clinical Streptococcus pneumoniae isolates from patients with pneumococcal
hemolytic uremic syndrome efficiently control host innate immune attack*”
- 06/2015 EMCHD 2015, 15th European Meeting on Complement in Human Disease
(Uppsala, Schweden)
„*Pneumococcal aHUS isolates show enhanced complement regulator binding
and express a new PspC variant*”
- 04/2015 MiCom 2015, 5th international student conference on microbial communication
(Jena, Deutschland)
„*From two clinical Streptococcus pneumoniae isolates of patients with atypical
hemolytic uremic syndrome a new isotype of the immune evasion protein
PspC was revealed*”

Poster

- 09/2016 46th Annual Meeting of the German Society for Immunology (Hamburg,
Deutschland)
“*Enhanced complement regulator binding by clinical isolates provides new
insights into pathology of pneumococcal hemolytic uremic syndrome*”
- 03/2014 MiCom 2014, 4th international student conference on microbial communication
(Jena, Deutschland)
„*PspC is an essential immune evasion protein of two clinical Streptococcus
pneumoniae isolates*”

Auszeichnungen

- 06/2015 „*Talk travel grant*“
EMCHD 2015, 15th European Meeting on Complement in Human Disease
(Uppsala, Schweden)
- 04/2015 „*Best talk*”
MiCom 2015, 5th international student conference on microbial communication
(Jena, Deutschland)

03/2014 „Poster award“
MiCom 2014, 4th international student conference on microbial communication
(Jena, Deutschland)

Publikationen

09/2016 „*S. pneumoniae* from HUS patients efficiently bind human regulators and
damage human endothelial cells by attached plasmin“
Manuskript eingereicht bei *Blood*

Danksagung

Das Zustandekommen dieser Dissertation wäre ohne das Mitwirken einiger Personen und Organisationen nicht möglich gewesen. Diesen möchte ich nachfolgend meinen Dank aussprechen.

Ich bedanke mich insbesondere bei **Prof. Dr. Peter F. Zipfel** für die Möglichkeit, meine Promotion in der Abteilung für Infektionsbiologie durchzuführen, sowie die Unterstützung und intensive Betreuung während meiner Dissertation. Ebenfalls danke ich **Prof. Dr. Christine Skerka** für die zahlreichen interessanten und wissenschaftlich anregenden Diskussionen, die einen großen Beitrag zur Vervollkommenung unseres Manuskripts leisteten. Des Weiteren bedanke ich mich für die Chancen, an internationalen Konferenzen teilnehmen zu dürfen und meiner Forschung in wissenschaftlich hochklassigem Umfeld Gehör zu verschaffen.

Ich danke der Exzellenz-Graduiertenschule **Jena School for Microbial Communication (JSMC)** für die dreijährige Förderung meines Promotionsprojektes sowie die vielen interessanten Weiterbildungsmöglichkeiten und Symposien, die meine fachliche Ausbildung in vielerlei Hinsicht gewinnbringend ergänzten. Des Weiteren möchte ich der **JSMC** sowie der **Deutschen Gesellschaft für Immunologie e. V.** für die Unterstützung meiner Teilnahme an Konferenzen durch Reisekostenbeihilfen meinen Dank aussprechen.

Ich danke ebenfalls meinen Kollegen der **Abteilung Infektionsbiologie** für die entgegengebrachte Unterstützung und die tolle, konstruktive Arbeitsatmosphäre. Vor allem möchte ich mich bei **Justus Linden** bedanken, der unsere gemeinsame Zeit im „Männerlabor“ 006 durch stimulierende, wissenschaftliche Diskussionen sowie zahlreiche interessante Anekdoten aus der Weltgeschichte und dem Simpsons-Universum zu etwas ganz Besonderem machte. Mein Dank gilt ebenfalls **Dr. Hans-Martin Dahse** aufgrund seiner Unterstützung bei der Etablierung der Zytotoxizitätsassays, **Eva-Maria Neumann**, die im Ernstfall immer HUVEC für mich parat hatte, **Monika von der Heide**, die mir mit Rat und Tat rund um die Themen PCR und Sequenzierung zur Seite stand sowie **Heike Gäbler**, die sich bei organisatorischen Problemen nicht nur für mich sondern für die gesamte Belegschaft engagierte.

Ich danke außerdem **Dr. Teresia Hallström**, die mich in die komplexe Thematik der Immunevasion von *S. pneumoniae* eingeführte, **Dr. Malik Reza** für seine Unterstützung bei der PspC-Expression, **Prof. Dr. Marc T. Figge** und **Dr. Zoltán Cseresnyés** für die bioinformatische Quantifizierung der HUVEC-Schädigung, **Prof. Dr. Rainer König** und **Franziska Hörhold** für unermüdliche Überarbeitung der PspC-Sequence alignments, **Prof. Dr. Sven Hammerschmidt** für Antiseren, rekombinante PspC-Fragmente sowie

S. pneumoniae-Referenzstämme und **Dr. med. Giuseppina Spartà** für die Bereitstellung der klinischen Pneumokokkenisolate.

Ich möchte ebenfalls meinen Freunden danken, insbesondere **Stefan Kretschmar**, **Sascha Blohm** und **Annika Düver**, **Marc Heiland**, **Florian Kalkbrenner** sowie **Christian Koity**, die immer für mich da waren, wenn Redebedarf bestand und während zahlreicher gemeinsamer Aktivitäten maßgeblich zur geistigen Erfrischung beitrugen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern **Birgit** und **Thomas Meinel**, die mir bei Problemen stets zur Seite standen und ohne deren Unterstützung weder mein Studium, noch die darauf aufbauende Promotion möglich gewesen wäre.

Ich möchte ebenfalls meinen Schwiegereltern **Christine** und **Reinhard Kürbs** meinen Dank aussprechen, die stets ein offenes Ohr für mich hatten, geduldig meinen sicher oft zu ausschweifenden Schilderungen lauschten und mir bei Bedarf mit Rat und Tat zur Seite standen.

Abschließend und in ganz besonderem Maße möchte ich meiner wundervollen Ehefrau **Carolin Meinel** danken. Ihre pure Lebensfreude ist ansteckend und eine wahre Inspiration. Trotz ihrer eigenen Promotion schafft sie es, mir daheim den Rücken frei zu halten und öffnet mir die Augen für die vielen schönen Dinge im Leben.